

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV**



**CASCADAS DE SEÑALIZACIÓN ACTIVADAS POR  
NUCLEÓTIDOS EN ASTROCITOS DE CEREBELO DE  
RATA: RECEPTORES P2X Y PSY IMPLICADOS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Luz María Gutiérrez Carrasquero**

Bajo la dirección de las doctoras  
Esmerilda García Delicado y María Teresa Miras Portugal

**Madrid, 2008**

- **ISBN: 978-84-692-1753-5**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**Facultad de Veterinaria**  
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**



**CASCADAS DE SEÑALIZACIÓN ACTIVADAS POR  
NUCLEÓTIDOS EN ASTROCITOS DE CEREBELO DE  
RATA: RECEPTORES P2X Y P2Y IMPLICADOS.**

**TESIS DOCTORAL**

**Luz María Gutiérrez Carrasquero**

**Madrid, 2008**



La **Dra. Esmerilda García Delicado** y la **Dra. María Teresa Miras Portugal**, Profesora Titular y Catedrática del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid respectivamente,

**CERTIFICAN:**

Que **D<sup>a</sup>. Luz María Gutiérrez Carrasquero**, Licenciada en Bioquímica por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo su dirección, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, el presente trabajo de investigación titulado “Cascadas de señalización activadas por nucleótidos en astrocitos de cerebelo de rata: Receptores P2X y P2Y implicados.” Como Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, Abril de 2008.

Vº Bº DIRECTORES

Dra. Esmerilda García Delicado

Dra. María Teresa Miras Portugal

La interesada:  
Luz María Gutiérrez Carrasquero





A mi madre por sus “milagros”.

A mi padre por todos los momentos en los que  
he comprobado la suerte que tengo de ser su hija.

A Emilio porque me hace feliz.



Quisiera dar las gracias a todas las personas que me han ayudado durante la realización de esta Tesis Doctoral. Sin su apoyo este trabajo hubiese sido imposible.

En primer lugar, quiero agradecer a la doctora María Teresa Miras Portugal la oportunidad que me ha dado de trabajar en su grupo. Estoy convencida de que no hubiera encontrado un lugar mejor donde dar mis primeros pasos científicos. Para mí siempre será un ejemplo de dedicación y amor a la Ciencia.

Por supuesto, esta Tesis no existiría sin la Dra. Esmerilda García Delicado. Gracias por tu apoyo y consejos. Han sido más de cinco años trabajando codo con codo que nunca olvidaré. Todo lo que he aprendido a tu lado constituyen los cimientos de mi formación científica y por ello, siempre te estaré agradecida.

De la Dra. Raquel Pérez Sen admiro su paciencia y rigor científico. Gracias por aguantar mis berrinches y quejas cuando me refugiaba en vuestro despacho. Sabes que un trocito de esta Tesis también es tuyo.

Los experimentos de imagen hubieran sido mucho más complicados sin la inestimable ayuda del Dr. Javier Gualix. Gracias por acudir en mi “auxilio” cada vez que el equipo cobraba “vida propia”.

No quiero olvidarme de la Dra. Dolores Fideu, que pacientemente se ha leído parte de este trabajo y me ha hecho correcciones siempre acertadas. Sus piropos matutinos nos ayudan a empezar el día con una sonrisa.

A la Dra. Magdalena Torres le agradezco su ayuda en mis comienzos en el “mundo del Western” y al Dr. José Sánchez Prieto su trato siempre correcto.

A mis compañeros de laboratorio les agradezco sus palabras de ánimo en los momentos bajos. Sin Nacho esta tesis tendría un formato muy diferente. Eres uno de los mejores compañeros que he tenido, te agradezco tu apoyo, no solo científico, sino también personal. Además, no olvides nunca que para gustos, los colores.

A Felipe le deseo mucha suerte, y paciencia, en la escritura de su Tesis. Mantén siempre ese buen humor que hace que trabajar contigo sea tan ameno. Sin ti, las comidas serían mucho más aburridas y además, nunca tendría pan.

A las no “tan pequeñas científicas” María y Miriam les deseo mucha suerte. Con lo trabajadoras que son seguro que la tendrán. No os desaniméis nunca, mirad el camino que ya habéis recorrido, seguro que al final todo merece la pena.

Elvira, espero que cuando regreses a tu casa nos recuerdes con cariño. Deseo que los buenos ratos superen a los malos y que tu esfuerzo se vea recompensado.

Estoy muy contenta de haber coincidido de nuevo con Rosa y Miguel. Fueron una referencia en mis comienzos y vuelven a serlo en el final. Rosa eres un ejemplo de como trabajar con seriedad y rigor sin perder la sonrisa. De mayor “quiero ser como tú”.

Tampoco me olvido del otro lado del labo. Gracias Mayka por escuchar mis penas y alegrías. Juntas hemos aprendido que las paredes a veces oyen. A Carolina le deseo muchísima suerte en la nueva etapa que comienza. Gracias a las dos por estar siempre dispuestas a echar

una mano. Sin vosotras, las esperas delante del equipo de revelado hubiesen sido mucho más tediosas.

Gracias a Ricardo, a David y a Elena por los chascarrillos a la hora de comer. ¿Qué sería la vida sin esos momentos?. Voy a echar de menos comer sin el codo del vecino metido en mi tupper.

Por supuesto que no me olvido de “nuestra” Elena. Siempre serás “mi friki favorita” con esos temas de conversación tan “diversos”.

También quiero dar las gracias a Jesús y a Patricia y a aquellos compañeros que ya han volado del nido, Sandra, Cristina, David y Maibrit. A los nuevos “fichajes”, Jorge, Javi y Salvatore, les deseo mucha suerte en la realización de su Tesis.

Me gustaría dar las gracias a Alba por facilitarnos la “vida administrativa” y a Mari Carmen por los paseos que nos ahorra al animalario.

Deseo dar las gracias al Dr. Christian Gachet por acogerme en su laboratorio durante mi estancia breve en Estrasburgo y a la Dra. Catherine Leon por hacer que fuera lo más cómoda posible.

No quiero olvidarme de la Dra. Teresa Iglesias que tanto me ha ayudado en la realización del trabajo sobre la PKD. Este agradecimiento es extensible a Lucía, por todas las horas que se ha pasado en el confocal.

Quiero dar las gracias a Carmen Fernández Criado y a todo su equipo por proporcionarnos los animales empleados en esta Tesis Doctoral.

Esta tesis se la dedico especialmente a mi madre. Me hubiera gustado compartir con ella todos los momentos importantes que estoy viviendo. Se que ella sigue cuidándome desde donde quiera que esté.

A mi padre le agradezco que no me haya dejado tirar la toalla. Me has enseñado que lo importante es luchar por aquello que deseas, pero sobre todo por aquellos a los que quieres. Se que pase lo que pase, si tú estás conmigo, tiene solución.

Emilio, has sido mi principal apoyo desde el día que te conocí. Gracias por tu paciencia y por regalarme tu sonrisa cada tarde cuando vienes a buscarme al labo. Consigues que desaparezcan todos los problemas por muy duro que haya sido el día.

También quiero dar las gracias al resto de mi familia y a mis amigos por preocuparse de la marcha de mi tesis. Agradezco vuestro apoyo.

Por último, quiero agradecerte a ti que leas esta Tesis Doctoral porque si el trabajo científico no se comparte, es como si no existiera.

A todos MUCHAS GRACIAS.

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a una beca de Formación del Profesorado Universitario del Ministerio de Educación y Ciencia. Asimismo, ha sido financiada con el proyecto BFU2005-02079 del Ministerio de Educación y Ciencia y por la Fundación Marcelino Botín.

## ABREVIATURAS

<b>AC</b>	Adenilato ciclasa
<b>Ado</b>	Adenosina
<b>ADP</b>	Adenosina-5'-difosfato
<b>AMP</b>	Adenosina-5'-monofosfato
<b>AMPA</b>	Ácido - $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilisazol-4-propiónico
<b>AMPC</b>	Adenosina-3',5'-monofosfato cíclico
<b>Ap<sub>5</sub>A</b>	P <sup>1</sup> ,P <sup>5</sup> -Di(Adenosina-5')pentafosfato
<b>Ap<sub>n</sub>A</b>	Diadenosina polifosfatos
<b>ATP</b>	Adenosina-5'-trifosfato
<b>ATP<math>\gamma</math>S</b>	Adenosina-5'-O-(3-tiotrifosfato)
<b>BAPTA-AM</b>	Ácido 1,2-bis( <i>o</i> -Aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético Tetra(acetoximetil) Ester
<b>BBG</b>	Brilliant Blue G
<b>BDNF</b>	Factor neurotrófico derivado de cerebro
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>BzATP</b>	3'-O-(4-benzoil)benzoil adenosina-5'-trifosfato
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub></b>	Concentración de calcio libre citosólico
<b>CaMKII</b>	Calcio/ calmodulina quinasa II
<b>DAG</b>	Diacylglicerol
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidino-2-fenilindol
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>EGTA</b>	Ácido etilén-bis(oxonitrilo)-tetraacético
<b>ERKs</b>	Quinasas reguladas extracelularmente
<b>FICT</b>	Isocianato de fluoresceína
<b>GABA</b>	Ácido $\gamma$ -amino butírico
<b>GADPH</b>	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
<b>GFAP</b>	Proteína glial fibrilar ácida
<b>GFP</b>	Proteína fluorescente verde
<b>GluR</b>	Receptor de glutamato
<b>GPCR</b>	Receptor acoplado a proteínas G
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintasa inducible
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol-1,4,5-trifosfato
<b>JNKs</b>	Quinasa de c-Jun
<b>Kidins220</b>	Sustrato de 220 KDa que interacciona con la quinasa D
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>MAPKs</b>	Proteínas quinasas reguladas por mitógenos

<b><math>\alpha,\beta</math>-meATP</b>	$\alpha,\beta$ -metilén-adenosina-5'-trifosfato
<b>2MeSADP</b>	2-Metil.tio-adenosina-5'-difosfato
<b>2MeSAMP</b>	2-Metil-tio-adenosina-5'-monofosfato
<b>2MeSATP</b>	2-Metil-tio-adenosina-5'-trifosfato
<b>MRS-2179</b>	2'-Deoxy-N <sup>6</sup> -metiladenosina 3',5'-bisfosfato
<b>NMDA</b>	Ácido N-metil-D-aspartico
<b>NMDG</b>	N-methyl-D-glucamina
<b>oATP</b>	Peryodato-oxidado ATP
<b>PDBu</b>	Forbol-12,13-dibutirato
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol 3-quinasa
<b>PI4K</b>	Fosfatidilinositol 4-quinasa
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato
<b>PKA</b>	Proteína quinasa A
<b>PKC</b>	Proteína quinasa C
<b>PKD</b>	Proteína quinasa D
<b>PKG</b>	Proteína quinasa G
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>PLD</b>	Fosfolipasa D
<b>PPADS</b>	Ácido piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-disulfónico
<b>PP2</b>	4-amino-5-(4-chlorofenil)-7-( <i>t</i> -butil)pirazolo[3,4- <i>d</i> ]pyrimidine
<b>Pyk2</b>	Tirosina quinasa rica en prolina 2
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
<b>TRICT</b>	Isocianato de tetrametilrodamina
<b>Tris</b>	Tris(hidroximetil)-aminometano
<b>U-0126</b>	1,4-Diamino-2,3-diciano-1,4-bis(2-aminofeniltio)butadieno
<b>U-73122</b>	1-[6-((17b-3-Metoxiestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)hexil]-1H-pirrol-2,5-diona
<b>U-73343</b>	1-[6-((17b-3-Metoxiestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)hexyl]-2,5-pirrolidinediona
<b>UDP</b>	Uridina 5'-difosfato
<b>UTP</b>	Uridina 5'-trifosfato

## INDICE

SUMMARY.	1
INTRODUCCIÓN.	15
1.- EL SISTEMA PURINÉRGICO.	
1.1.- Liberación y degradación de los nucleótidos.	17
1.2.- Receptores de nucleótidos.	22
1.3.- Receptores ionotrópicos P2X.	23
1.3.1.- Estructura y topología transmembrana de las subunidades P2X.	24
1.3.2.- Oligomerización.	31
1.3.3.- Características funcionales.	32
1.3.3.1.- Farmacología.	34
1.3.3.2.- Mecanismos de transducción de señal.	36
1.3.4.- Expresión tisular e importancia fisiológica.	38
1.4.- Receptores metabotrópicos P2Y.	40
1.4.1.- Estructura y topología transmembrana de los receptores P2Y.	41
1.4.2.- Posible dimerización.	43
1.4.3.- Características funcionales de los receptores P2Y.	44
1.4.3.1.- Farmacología.	46
1.4.3.2.- Vías de señalización intracelular.	47
1.4.4.- Expresión tisular e importancia fisiológica.	50
2.- PROTEÍNA QUINASA D.	55
2.1.- Estructura y función de los diferentes dominios estructurales.	55
2.2.- Mecanismos de activación de PKD.	57
2.3.- Vías de señalización intracelular e importancia fisiológica.	58
2.3.1.- Proliferación, diferenciación y apoptosis.	58
2.3.2.- Estrés oxidativo.	59
2.3.3.- Extensión de las neuritas y diferenciación neuronal.	60
2.3.4.- Motilidad, invasión y adhesión celular.	60
2.3.5.- PKD en el sistema inmune.	60
2.3.6.- Regulación del transporte de proteínas desde el trans-Golgi a la membrana plasmática.	61
3.- LAS CÉLULAS GLIALES.	63
3.1.- Tipos de células gliales y sus funciones.	63
3.2.- Importancia de los astrocitos en sistema nervioso.	65
3.2.1.- Regulación de la transmisión sináptica.	66
3.2.2.- Regulación de la microvasculatura cerebral.	69
3.2.3.- Regulación de la sinaptogénesis.	70
4.- EL CEREBELO.	71
4.1.- Anatomía e histología del cerebelo.	71
4.2.- Circuito neuronal de la corteza cerebelosa.	73
4.2.1.- Vías eferentes y aferentes.	74
4.2.2.- Conexiones intracorticales inhibitorias.	75
4.3.- Nuevas funciones del cerebelo.	76



4.4.- El sistema purinérgico en cerebelo.	77
OBJETIVOS.	79
MATERIALES Y MÉTODOS.	83
1.- MATERIALES.	85
1.1.- Material biológico.	85
1.2.- Instrumentación.	85
1.3.- Reactivos.	87
2.- MÉTODOS.	89
2.1.- Aislamiento y cultivo de astrocitos cerebelosos tipo I.	89
2.1.1.- Obtención de células de cerebelo.	89
2.1.2.- Determinación del número de células y de la integridad celular.	89
2.1.3.- Cultivo primario enriquecido en astrocitos cerebelosos tipo I.	90
2.1.4.- Pasaje de astrocitos cerebelosos.	91
2.2 Análisis de RNAm en astrocitos tipo I de cerebelo.	92
2.2.1.- Extracción de RNA.	92
2.2.2.- Cuantificación de RNA.	92
2.2.3.- Experimentos de RT-PCR.	92
2.3.- Determinaciones fluorimétricas de calcio.	94
2.3.1.- Determinación microfluorimétrica de la concentración de calcio libre intracelular, $[Ca^{2+}]_i$ , en astrocitos individuales.	94
2.3.2.- Determinación fluorimétrica de $[Ca^{2+}]_i$ en poblaciones celulares.	97
2.4.- Experimentos de inmunocitoquímica.	98
2.5.- Determinación de los niveles intracelulares de AMP cíclico.	99
2.6.- Experimentos de inmunotransferencia.	100
2.6.1.- Lisado de células y extracción de proteínas totales.	100
2.6.2.- Electroforesis, transferencia y revelado de las membranas.	100
2.6.3.- Condiciones de los experimentos de inmunotransferencia para la detección de la proteína ERK.	102
2.6.4.- Condiciones de los experimentos de inmunotransferencia para la detección de la proteína quinasa D.	103
2.7.- Determinación de proteínas.	104
2.8.- Expresión de los receptores $P2Y_1$ y $P2Y_{13}$ en células de astrocitoma 1321N1.	104
2.8.1.- Obtención del plásmido con la secuencia del receptor $P2Y_{13}$ .	104
2.8.2.- Obtención de células establemente transfectadas.	106
2.9.- Sobreexpresión de PKD activa y de PKD quinasa-inactiva en astrocitos de cerebelo.	106
2.9.1.- Construcción de los plásmidos.	106
2.9.2.- Transfección transitoria de las células.	107
2.10.- Estudios de viabilidad celular.	108
2.11.- Experimentos de entrada de la sonda Yo-Pro-1.	108
2.12.- Estudios de migración celular.	108
2.13.- Análisis estadístico y presentación de resultados.	109

RESULTADOS.	111
1.- CARACTERIZACIÓN DE LOS RECEPTORES DE ADP PRESENTES EN LOS ASTROCITOS TIPO 1 DE CEREBELO DE RATA Y SU SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR.	113
1.1.- Identificación de los receptores de ADP presentes en los astrocitos de cerebelo.	113
1.2.- Inhibición de la producción de AMPc por receptores de ADP acoplados a proteínas $G_i$ .	115
1.3.- Caracterización de las respuestas de calcio inducidas por 2MeSADP en los astrocitos tipo 1 de cerebelo.	117
1.3.1.- Respuestas de calcio inducidas por 2MeSADP en poblaciones celulares.	117
1.3.2.- Caracterización de las respuestas de calcio inducidas por 2MeSADP en astrocitos individuales.	121
1.4.- Exploración de la fosforilación mediada por nucleótidos de distintas proteínas intracelulares.	124
1.5.- Activación de la proteína ERK inducida por la estimulación con 2MeSADP en astrocitos de cerebelo.	126
1.6.- Expresión de los receptores $P2Y_1$ y $P2Y_{13}$ en células de astrocitoma 1321N1.	130
2.- CARACTERIZACIÓN DEL RECEPTOR DIANA DE BzATP EN ASTROCITOS DE CEREBELO DE RATA Y SUS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR.	131
2.1.- Identificación de las subunidades P2X en astrocitos de cerebelo tipo1.	132
2.2.- Caracterización de las respuestas de calcio inducidas por BzATP en astrocitos de cerebelo.	135
2.2.1.- Análisis de las respuestas de calcio inducidas por BzATP en poblaciones de astrocitos tipo 1.	135
2.2.2.- Caracterización de las respuestas de calcio producidas por BzATP en astrocitos individuales.	137
2.2.2.1.- Efecto de los antagonistas de los receptores nucleotídicos.	143
2.2.2.2.- Modulación de las respuestas a BzATP por iones.	144
2.3.- Cascadas de señalización intracelular activadas por BzATP en los astrocitos cerebelosos de rata.	146
2.3.1.- Caracterización de la activación de PKD inducida por nucleótidos.	147
2.3.1.1.- Translocación de PKD1 inducida por BzATP.	155
2.3.2.- Estudio de la activación de la proteína ERK por BzATP en astrocitos tipo1 de cerebelo de rata.	158
2.4.- Análisis de la migración celular inducida por nucleótidos.	164
DISCUSIÓN.	167
1.- LOS ASTROCITOS DE CEREBELO DE RATA COEXPRESAN VARIOS SUBTIPOS DE RECEPTORES DE ADP ACOPLADOS A DIFERENTES VÍAS DE SEÑALIZACIÓN.	169
1.1.- Los astrocitos de cerebelo de rata expresan un receptor $P2Y_{13}$ -like acoplado a la inhibición de la adenilato ciclasa a través de una proteína $G_{i/o}$ .	169

1.2.- El receptor P2Y <sub>13</sub> -like activa diferentes cascadas de señalización en los astrocitos de cerebelo de rata.	170
1.2.1.- Cascada de activación de las proteínas ERKs por 2MeSADP.	172
1.3.- Posible segregación de los receptores de ADP en dominios específicos de la membrana plasmática.	174
2.- LOS ASTROCITOS DE CEREBELO DE RATA EXPRESAN UN RECEPTOR P2X7-LIKE CON CARACTERÍSTICAS MUY PECULIARES.	176
2.1.- El receptor P2X <sub>7</sub> -like en los astrocitos de cerebelo activa cascadas de señalización metabotrópicas e ionotrópicas.	177
2.2.- Los receptores P2X <sub>7</sub> -like y P2Y <sub>2</sub> activan la cascada de las proteínas ERKs a través de una proteína G <sub>i/o</sub> .	180
2.3.- El receptor P2X <sub>7</sub> -like activa a la PKD mediante cascadas de señalización ionotrópicas y metabotrópicas.	182
2.4.- Posibles implicaciones fisiológicas de la activación de los receptores de nucleótidos en los astrocitos de cerebelo.	185
CONCLUSIONES.	187
BIBLIOGRAFÍA.	191





## Summary

---



## 1.- INTRODUCTION

Nucleotides act as extracellular messengers in most organs and systems. They are involved in multiple biological events, including proliferation, differentiation, migration, apoptosis, neurotransmission and neurogenesis. Nucleotides can exert these actions through specific receptors, known as P2 type purinergic receptors, classified into ionotropic P2X receptors and metabotropic P2Y receptors. The first subtype are ligand-gated ion channels that gate extracellular cations,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{+}$  and  $\text{K}^{+}$ , in response to ATP. These receptors consist of homo- and hetero-oligomers formed by the assembly of different subunits (P2X<sub>1</sub> through P2X<sub>7</sub>) (North, 2002). P2X<sub>7</sub> is considered an atypical P2X receptor because it requires for its activation ATP concentrations an order of magnitude higher than other P2X family members. In addition, its C-terminal domain is much longer than those of other P2X subunits. P2X<sub>7</sub> receptor was originally identified as the cytolytic P2Z receptor of the monocyte-macrophage lineage and was considered exclusive for immune system (Surprenant and cols., 1996). Afterwards, it has also been described in other cellular types including neural cells, in which it could mediate proliferation and differentiation, as well as neurotransmission (Deuchars and cols., 2001; Duan and cols., 2003; Hervas and cols., 2005; Panenka and cols., 2001; Sanchez-Nogueiro and cols., 2005).

The P2Y receptors are G protein-coupled receptors. To this date seven mammalian P2Y receptors have been cloned (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> and P2Y<sub>14</sub>) (Abbracchio and cols., 2003). Pharmacologically P2Y receptors can be classified into receptors activated by adenine nucleotides (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> and human P2Y<sub>11</sub>), receptors activated by uridine nucleotides (human P2Y<sub>4</sub> and P2Y<sub>6</sub>) and receptors with mixed selectivity (P2Y<sub>2</sub> and rodent P2Y<sub>4</sub>). P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub> and P2Y<sub>13</sub> receptors are selective for ADP and are coupled to several intracellular pathways. P2Y<sub>1</sub> receptor activates PLC and induces intracellular calcium mobilization, whereas activation of P2Y<sub>12</sub> and P2Y<sub>13</sub> receptors is coupled to G<sub>i</sub> protein, leading to adenylate cyclase inhibition.

Usually, several P2 receptors are coexpressing in the same tissue, so they are difficult to characterize “in vivo” and their intracellular signalling is not well known. Nucleotide receptors can activate various proteins, such as phospholipase C, protein kinases C, MAP kinases, PI-3 kinase, PKD, etc. (Bradford and Soltoff, 2002; Erb and cols., 2006).

Our group has been focused on purinergic receptor characterization in different models, such as synaptosomal preparations from several brain regions and cultures of neurons and glial cells from rat cerebellum (P7). We have reported that purinergic receptors are present in Purkinje and granular neurons and in cerebellar astrocytes (Hervas and cols., 2003; Mateo and cols., 1998). In this last cell type, various metabotropic P2Y receptors (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2/4</sub> and P2Y<sub>6</sub> receptors), but no ionotropic P2X receptors, are being expressed (Jimenez and cols., 2000). The cloning of new P2Y receptors subtypes specific for ADP, P2Y<sub>12</sub> and P2Y<sub>13</sub> (Hollopeter and cols., 2001; Zhang and cols., 2001), and the identification of P2X<sub>7</sub> receptor in the nervous system led us to search their presence in astrocytes and



characterize their intracellular signalling pathway.

## 2.- RESULTS

### **2.1.- Characterization of ADP receptors expressed in rat cultured cerebellar astrocytes**

Several strategies can be used to study the presence of a receptor in a cellular model. They include RT-PCR experiments, immunocytochemistry studies and biochemical and pharmacological approaches to prove its functionality.

#### **2.1.1.- Identification of ADP receptors present in cerebellar astrocytes**

RT-PCR analysis showed that cerebellar astrocytes co-express mRNA codifying for the three ADP receptors subtypes, P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub> and P2Y<sub>13</sub> receptors. Sometimes, there is no correlation between detection of the mRNA and the presence of the protein. Thus, we also carried out immunocytochemistry experiments using antibodies against P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>12</sub> receptors. There was no specific labelling of astrocytes with anti-P2Y<sub>12</sub> receptor antibody, whereas a specific staining was observed with anti-P2Y<sub>1</sub> receptor antibody in the same experimental conditions.

#### **2.1.1.- Inhibition of cAMP production by G<sub>i</sub>-linked ADP receptors**

Based on the fact that cerebellar astrocytes possess  $\beta$ -adrenergic receptors coupled to adenylate cyclase activation (Jimenez and cols., 1999), the functionality of G<sub>i</sub>-linked ADP receptors was investigated by analysing the effect of specific agonists, 2MeSADP and ADP, on cAMP production induced by isoproterenol. These experiments were carried out in the presence of MRS-2179, a specific inhibitor of P2Y<sub>1</sub> receptor, in order to avoid any response mediated by this receptor. Co-stimulation of astrocytes with 2MeSADP or ADP and isoproterenol reduced the isoproterenol-increased cAMP levels in a dose-dependent manner, reaching a maximum of 40% reduction at 10  $\mu$ M agonist concentration. The IC<sub>50</sub> values were  $46 \pm 13$  nM and  $23 \pm 14$  nM for 2MeSADP and ADP respectively. The similar potency displayed by both agonists suggests that the ADP receptor that mediates this inhibition was a P2Y<sub>13</sub>-like receptor. The pharmacological profile of P2Y<sub>12</sub> receptor is quite different, 2MeSADP is 20-30 times more potent than ADP (Communi and cols., 2001; Hollopeter and cols., 2001; Marteau and cols., 2003; Simon and cols., 2002; Zhang and cols., 2001).

To confirm the involvement of a P2Y<sub>13</sub>-like receptor in the adenylate cyclase inhibition we examined the action of 2MeSAMP, a P2Y<sub>12</sub> receptor antagonist (Hollopeter and cols., 2001; Takasaki and cols., 2001). Preincubation of astrocytes with 100  $\mu$ M 2MeSAMP for 3 minutes did not revert the inhibition displayed by 2MeSADP.

Finally, we tested whether the inhibition of adenylate cyclase by P2Y agonists was associated with G $\alpha_i$  protein. For this purpose, astrocytes were preincubated overnight with 100 ng/mL *pertussis toxin* previous to carrying out cAMP determinations. This pretreatment

completely abolished the inhibitory effect of 2MeSADP indicating the involvement of a  $G_{i/o}$  protein.

### 2.1.2.- Characterization of calcium responses induced by 2MeSADP

A difference between  $P2Y_{12}$  and  $P2Y_{13}$  receptors is that the latter also couples to PLC activation (Communi and cols., 2001). Thus, we decided to investigate whether 2MeSADP induce calcium mobilization.

In a first approach, we analyzed calcium responses in astrocyte populations using fluorimetric assays with the fluorescence dye fura-2. Stimulation of cells with 10  $\mu$ M 2MeSADP elicited  $[Ca^{2+}]_i$  increases of  $360 \pm 45$  nM. These responses were not affected by preincubation with 10  $\mu$ M MRS-2179 and/or 100  $\mu$ M 2MeSAMP, demonstrating that they were not mediated by  $P2Y_1$  or  $P2Y_{12}$  receptors. On the other hand, when astrocytes were treated overnight with 100 ng/mL *pertussis toxin*, the  $[Ca^{2+}]_i$  increases elicited by 2MeSADP corresponded to 30% of those obtained in untreated control cells.

Afterwards, the characterization of 2MeSADP calcium responses was carried out in individual astrocytes. All tested cells responded to 10  $\mu$ M 2MeSADP with  $[Ca^{2+}]_i$  transients, but the magnitude of the calcium responses observed in the presence of MRS-2179 was very heterogeneous. We found three groups of cells: A) cells in which 2MeSADP calcium responses were not prevented by this antagonist, B) cells that were partially sensitive to MRS-2179 antagonism, which showed between 31 to 70% of control responses (49% of tested cells) and C) astrocytes in which 2MeSADP responses were completely abolished by MRS-2179 (13% of tested cells). The same distribution pattern of calcium responses was obtained after preincubation with the two antagonists MRS-2179 and 2MeSAMP.

To discriminate between  $P2Y_1$  and  $P2Y_{13}$ -like receptors expressed in astrocytes concentration-responses curves for 2MeSADP in the presence and absence of MRS-2179 were carried out. The  $EC_{50}$  values were  $1,44 \pm 0,25$   $\mu$ M and  $14,19 \pm 2,35$  nM, respectively. When these results were analyzed in detail we observed that intracellular calcium mobilization induced by 100 nM of agonist, which represents 90% of maximum response, was completely abolished by MRS-2179.

These results suggested that the responses induced by low concentrations of 2MeSADP were mediated by  $P2Y_1$  receptors, but astrocytes also express other ADP receptor that was being activated by high agonist concentration, being the best candidate a  $P2Y_{13}$  type receptor.

### 2.1.3.- 2MeSADP-stimulated ERK activation through $P2Y_{13}$ -like receptor in cerebellar astrocytes

Some purinergic receptors are also coupled to ERKs activation. To examine this possibility, western blot experiments, using antibodies that recognize the phosphorylated and unphosphorylated forms of p42 and p44 isoforms, were carried out. Astrocyte stimulation

with 10  $\mu$ M 2MeSADP increased the phosphorylation level of ERK1 and ERK2. The ERK activation was about two times over basal levels. This effect was completely prevented by the specific MEK inhibitor U-0126.

Activation of ERK was transitory, with maximal response at 5 minutes, and concentration-dependent with an  $EC_{50}$  value of  $48,5 \pm 5,92$  nM, the maximal effect was observed at 1  $\mu$ M. In order to determine what receptor was mediating this response we carried out the same experiments in the presence of MRS-2179. In this case, dosis-response curve was similar to that obtained in control conditions. The  $EC_{50}$  value calculated was  $20,98 \pm 2,20$  nM.

ERK phosphorylation was insensitive to intracellular calcium chelator BAPTA-AM, but it was abolished by *pertussis toxin*, by PP2, a Src proteins inhibitor, and by long-term treatment with phorbol esters. So, ERK activation is mediated by a  $G_{i/o}$  protein, Src proteins and novel PKCs, which were calcium independent and regulated by DAG.

## **2.2.- Characterization of functional P2X<sub>7</sub>-like receptors in rat cerebellar astrocytes**

Previous studies revealed that calcium responses elicited by 100  $\mu$ M ATP were not affected by the removal of extracellular calcium so it led us to think that cerebellar astrocytes did not express functional P2X receptors. But these experiments did not exclude P2X<sub>7</sub> receptor expression because this agonist concentration was not enough to activate it. Thus we decided to analyze P2X<sub>7</sub> functionality using BzATP that is an agonist of P2X<sub>7</sub> receptor 10-30 times more potent than ATP (North, 2002). It is necessary to bear in mind that BzATP also acts on other P2X receptors and on metabotropic P2Y<sub>11</sub> receptor (Bianchi and cols., 1999; Communi and cols., 1999), but in our model these interactions were excluded (Jimenez and cols., 2000).

It has been described that P2X<sub>7</sub> receptor in macrophages activates signalling pathways which induces a cytolytic pore formation by recruitment of different proteins (Faria and cols., 2005; Jiang and cols., 2005; Pelegrin and Surprenant, 2006). In order to check this possibility, we recorded uptake of Yo-Pro1, a fluorescent DNA chelating dye. In cerebellar astrocytes there was no accumulation of the dye for one hour incubation with 100  $\mu$ M BzATP, which ruled out the pore formation. This result was confirmed by using a cellular viability kit. In these experiments we also observed that incubations with BzATP induced morphological changes, which were not mimicked by other nucleotides, such as UTP or 2MeSADP. Although the best candidate for mediating this effect was P2X<sub>7</sub> receptor, we have investigated the presence of all the P2X receptors cloned so far.

To analyze the P2X expression, RT-PCR experiments were performed. In these assays high levels of mRNA for P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub> and P2X<sub>7</sub> were detected. In contrast, P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>5</sub> and P2X<sub>6</sub> subunits appeared to be nearly absent in astrocyte cultures. In most cases the mRNA detection did not correlate with the presence of the protein. Using specific antibodies against the different P2X subunits, only specific immunolabeling for P2X<sub>4</sub> and P2X<sub>7</sub> proteins

was found. No detection of P2X<sub>1</sub> and P2X<sub>3</sub> proteins explains the lack of responses to  $\alpha,\beta$ -meATP, the specific agonist of these P2X subtypes.

### 2.2.1.- Characterization of calcium responses induced by BzATP

In order to study the functionality of P2X<sub>7</sub> receptor we analyzed calcium responses induced by BzATP. Stimulation with 100  $\mu$ M of this agonist was able to elicit  $[Ca^{2+}]_i$  rises in astrocyte populations. The kinetic of the responses was totally different from those induced by other nucleotides. While calcium responses evoked by 2MeSADP or UTP were transient, those elicited by BzATP were maintained and even rising during the time of agonist application.

Given that ATP concentrations higher than 100  $\mu$ M were required for P2X<sub>7</sub> receptor activation, we have reanalyzed the ATP calcium responses using concentrations up to 3-5 mM, in order to compare them to those triggered by BzATP in the same experimental conditions. In this case, the shape of ATP calcium responses elicited by 3 mM ATP was completely different to those induced by BzATP and similar to that observed when cells were stimulated with 100  $\mu$ M UTP. This result confirms that ATP was interacting with the metabotropic P2Y<sub>2</sub> receptor, which is homogeneously distributed in all astrocyte population.

#### 2.2.1.1.- Characterization of BzATP calcium responses in individual astrocytes.

To know the nature of the putative P2X<sub>7</sub> receptor present in cerebellar astrocytes, we studied the pharmacological profile of BzATP calcium responses. This was made in individual cells in order to better compare to those previously reported for 2MeSADP and UTP. All tested cells responded to 100  $\mu$ M BzATP with  $\Delta F_{340}/F_{380}$  of  $0,38 \pm 0,02$ . The effect was dose-dependent with an EC<sub>50</sub> value of  $15,3 \pm 3,5$   $\mu$ M and maximal response reached at 300  $\mu$ M.

When astrocytes were stimulated with BzATP for several minutes, biphasic responses, with an initial transient component followed by a tonic phase, were observed in the majority of cells (83%). Only a small percentage of astrocytes presented calcium responses with an unique component. The removing of extracellular calcium completely abolished the sustained component, but, to our surprise, the initial transient was maintained. This result indicates the involvement of both an ionotropic and a metabotropic mechanism. The participation of phospholipase C (PLC) was investigated by using U-73122, a PLC inhibitor. After 3 minutes preincubation with 3  $\mu$ M U-73122, the calcium responses elicited by BzATP only displayed the tonic component. Similar preincubation with U-73343, an inactive analogue of U-73122, did not modify the shape of calcium responses.

To confirm that BzATP was activating a P2X<sub>7</sub> receptor we examined the effect of PPADS and BBG, two antagonists of this receptor subtype (Bianchi and cols., 1999; Jiang and cols., 2000). These compounds affected BzATP calcium responses although they exhibited different behaviour. Preincubation of astrocytes for 3 minutes with 1  $\mu$ M BBG

completely depressed the tonic component, while the initial transient was reduced by 30%. At variance, 30  $\mu$ M PPADS suppressed the two components of BzATP calcium responses. None of these antagonist modified ATP or UTP calcium responses, corroborating again that ATP and BzATP interact with different receptors, the P2X<sub>7</sub>-like and the PPADS-insensitive P2Y<sub>2</sub> receptors.

It is well known that P2X<sub>7</sub> receptor responses were modulated by divalent cations (Acuna-Castillo and cols., 2007; Liu and cols., 2008). So, we also studied the effect of divalent cations on the BzATP calcium responses. In the presence of high Mg<sup>2+</sup> concentrations or Zn<sup>2+</sup>, the percentage of cells that only exhibited transient responses increased and, in those cells that showed biphasic responses, the magnitude of the second phase decreased. On the contrary, in the absence of Mg<sup>2+</sup>, there was an increase in the number of cells that exhibited biphasic responses rising over the entire stimulation period. In any case transitory component was significantly modified.

### **2.2.2.- Intracellular signalling pathways activated by BzATP in cerebellar astrocytes**

In order to determine what mechanism was mediating the morphological changes induced by BzATP, we analyzed how this nucleotide modified the phosphorylation state of ERKs and PKD. Both proteins can be activated by purinergic receptors and are involved in cell differentiation (Bradford and Soltoff, 2002; Gendron and cols., 2003). Protein kinase D, also called PKC $\mu$ , is serine/threonine kinase distantly related to the PKC family, which has been implicated in the regulation of multiple biological processes, including Golgi function, cell growth, apoptotic events, tumour invasion and even in brain physiology.

#### 2.2.2.1.- Characterization of PKD activation induced by nucleotides in cerebellar astrocytes

We focused on the study of the activation of protein kinase D by nucleotides due to the fact that, just as the P2 receptors, it is also expressed in immune and nervous system and it is involved in apoptosis, neurite growth, growth cone organization, cellular proliferation and other processes in which nucleotide participation has been described. PKD activation was analyzed by immunoblotting using the antibody recognizing the autophosphorylated site (Ser<sup>916</sup>), which correlates with PKD enzyme activity when this residue is phosphorylated.

2MeSADP 10  $\mu$ M did not induce PKD phosphorylation, while 100  $\mu$ M UTP and 100  $\mu$ M BzATP promoted a phosphorylation level increase about 12-15 fold over basal. This activation was time-dependent with a maximal response at 5 minutes. BzATP activated PKD in a concentration-dependent manner, showing an EC<sub>50</sub> value of 67,75  $\pm$  11,3  $\mu$ M, reaching the maximum at 300  $\mu$ M, which corresponded to 18-fold above basal level.

Afterwards, we analyzed the effect of BBG and PPADS on PKD phosphorylation to confirm whether P2X<sub>7</sub> receptor was mediating BzATP responses. Both antagonists blocked PKD activation induced by BzATP, and, as expected, neither of them modified the UTP-induced PKD stimulation.



Given that the stimulation of P2X<sub>7</sub> and P2Y<sub>2</sub> receptors elicited a rise in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, we studied the PKD activation calcium-dependence. In the absence of extracellular calcium, BzATP was still able to activate PKD having 80% of the response obtained in normal conditions. UTP-stimulated PKD phosphorylation was also independent of intracellular calcium, in this case effect of BAPTA-AM (30 minutes, 10 μM) was tested. This calcium independence agreed well with the participation of the novel PKCη and PKCε isoform, which are regulated by DAG. These nPKCs transphosphorylated two residues (Ser<sup>744</sup> and Ser<sup>748</sup>) that are located in PKD activation loop, leading to PKD activation. To address this issue, cells were preincubated 3 minutes with 3 μM Gö6850, a nPKC inhibitor. This compound completely abolished PKD activation. DAG production can be induced by PLC. So, cells were pretreated with 3 μM U-73122 for 3 minutes previous to be stimulated with nucleotides. This treatment completely prevented PKD phosphorylation induced by UTP and strongly reduced that elicited by BzATP, whereas the inactive analogue U-73343 had no effect in the same conditions. When cells are pretreated with U-73122 plus EGTA, the BzATP effect is completely abolished, suggesting that PKD phosphorylation is mediating by metabotropic and ionotropic mechanisms. To check what G protein was involved, we analyzed *pertussis toxin* effect. This treatment did no modified PKD activation induced by both agonists, indicating that G<sub>q</sub> proteins were implicated.

Studies carried out with GFP-PKD fusion proteins demonstrated that PKD activation was accompanied by changes in its intracellular locations, shuttled from cytosol to plasma membrane and even to the nucleus, although they were independent processes (Matthews and cols., 1999). We next examined whether GFP-PKD, transiently transfected into astrocytes, undergoes translocation in responses to 100 μM BzATP or UTP. Neither of these antagonists modified PKD location. Considering that 100 μM BzATP was a submaximal effective concentration, perhaps higher agonist concentrations were required. To check this possibility time course experiments were carried out using 300 μM BzATP. In these conditions, after 20-30 minutes of incubation, PKD was irreversibly translocated to plasma membrane. When GFP-PKD activation was analyzed by western blot the pattern of endogenous PKD activation was reproduced. The translocation phenomenon was also sensitive to BBG and PPADS.

#### 2.2.2.2.- Characterization of ERKs activation by nucleotides in astrocytes

ERKs proteins were activated by 100 μM BzATP or UTP in larger extension than by 10 μM 2MeSADP. BzATP-induced ERKs phosphorylation was dose-dependent, with an EC<sub>50</sub> value of 27,38 ± 3,87 μM, reaching the maximum effect at 100 μM at 5 minutes of stimulation. Effect of P2X<sub>7</sub> receptor antagonists was variable. PPADS abolished PKD activation elicited by BzATP, while BBG diminished ERKs phosphorylation about 30%.

Again, we analyzed whether ERKs activation was calcium dependent. Calcium chelators, EGTA and BAPTA-AM, did no affect BzATP and UTP responses, respectively. However, ERKs activation induced by BzATP was reduced about 30% when astrocytes were

preincubated with EGTA plus BAPTA.

To establish what mechanism is involved in ERKs activation induced by UTP and BzATP we checked the effect of several treatments. In both cases ERKs phosphorylation was abolished by preincubation with *pertussis toxin*, PLC inhibitor U-73122 and nPKCs inhibitor Gö6850. On the contrary, PP2 (10  $\mu$ M, 30 minutes) an inhibitor of Src proteins, did not have an effect.

### 3.- CONCLUDING REMARKS

On sight of these results we can conclude:

1.- Cerebellar astrocytes coexpress two ADP receptor subtypes which can be simultaneously activated at nanomolar concentrations of the nucleotide, P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>13</sub>-like receptors. P2Y<sub>1</sub> receptor induces PLC activation and intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilitation and P2Y<sub>13</sub>-like receptor is coupled to adenylate cyclase inhibition.

2.- P2Y<sub>13</sub>-like receptor also elicited ERKs activation by an intracellular mechanism that involve G<sub>i/o</sub> proteins, Src and calcium-independent PKCs. This receptor is also coupled to PLC at high agonist concentrations.

An interaction between both receptors can not be excluded. It is possible that a cross-talk between intracellular signalling pathways exists similar to the interaction between P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>12</sub> receptors described by Hardy and colleagues (Hardy and cols., 2004). However, a “physical interaction” can not be ruled out. There are some evidence suggesting that P2Y receptors can form homo- and heterodimers (Choi and cols., 2008; D’Ambrosi and cols., 2006; Ecke and cols., 2008; Savi and cols., 2006).

3.- A P2X<sub>7</sub>-like receptor is expressed in rat cerebellar astrocytes. This receptor eeeeeThis phenomenon, namely ionotropic receptors displaying metabotropic activity, has been described for several ionotropic receptors, such as acetylcholine nicotinic receptors, AMPA receptors or Kainate receptors (Giovannelli and cols., 1991; Rodriguez-Moreno and Lerma, 1998; Rozas and cols., 2003; Sorenson and Gallagher, 1996).

Some authors have proposed that several P2X<sub>7</sub> receptor conformations could exist (Garcia-Marcos and cols., 2006; Li and cols., 2003). Maybe, in astrocytes, two P2X<sub>7</sub> receptor forms exist. One of them would be responsible of PLC and ERKs activation mediated by Gi proteins. The other conformation would mediate channel activity. PKD activation would be mediated by the two P2X<sub>7</sub> receptor forms.

### REFERENCES

- Abbracchio, M. P., Boeynaems, J. M., Barnard, E. A., Boyer, J. L., Kennedy, C., Miras-Portugal, M. T., King, B. F., Gachet, C., Jacobson, K. A., Weisman, G. A. and Burnstock, G. (2003). “Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y<sub>14</sub> receptor) adds diversity to the P2Y receptor family.” *Trends Pharmacol Sci* **24**(2): 52-5.
- Acuna-Castillo, C., Coddou, C., Bull, P., Brito, J. and Huidobro-Toro, J. P. (2007). “Differential

- role of extracellular histidines in copper, zinc, magnesium and proton modulation of the P2X7 purinergic receptor.” *J Neurochem* **101**(1): 17-26.
- Bianchi, B. R., Lynch, K. J., Touma, E., Niforatos, W., Burgard, E. C., Alexander, K. M., Park, H. S., Yu, H., Metzger, R., Kowaluk, E., Jarvis, M. F. and van Biesen, T. (1999). “Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes.” *Eur J Pharmacol* **376**(1-2): 127-38.
- Bradford, M. D. and Soltoff, S. P. (2002). “P2X7 receptors activate protein kinase D and p42/p44 mitogen-activated protein kinase (MAPK) downstream of protein kinase C.” *Biochem J* **366**(Pt 3): 745-55.
- Communi, D., Gonzalez, N. S., Detheux, M., Brezillon, S., Lannoy, V., Parmentier, M. and Boeynaems, J. M. (2001). “Identification of a novel human ADP receptor coupled to G(i).” *J Biol Chem* **276**(44): 41479-85.
- Communi, D., Robaye, B. and Boeynaems, J. M. (1999). “Pharmacological characterization of the human P2Y<sub>11</sub> receptor.” *Br J Pharmacol* **128**(6): 1199-206.
- Choi, R. C., Simon, J., Tsim, K. W. and Barnard, E. A. (2008). “Constitutive and agonist-induced dimerizations of the P2Y<sub>1</sub> receptor: Relationship to internalization and scaffolding.” *J Biol Chem*.
- D’Ambrosi, N., Iafrate, M., Vacca, F., Amadio, S., Tozzi, A., Mercuri, N. and Volonte, C. (2006). “The P2Y<sub>4</sub> receptor forms homo-oligomeric complexes in several CNS and PNS neural cells.” *Purinergic Signalling* **2**: 575-582.
- Deuchars, S. A., Atkinson, L., Brooke, R. E., Musa, H., Milligan, C. J., Batten, T. F., Buckley, N. J., Parson, S. H. and Deuchars, J. (2001). “Neuronal P2X7 receptors are targeted to presynaptic terminals in the central and peripheral nervous systems.” *J Neurosci* **21**(18): 7143-52.
- Duan, S., Anderson, C. M., Keung, E. C., Chen, Y., Chen, Y. and Swanson, R. A. (2003). “P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes.” *J Neurosci* **23**(4): 1320-8.
- Ecke, D., Hanck, T., Tulapurkar, M. E., Schafer, R., Kassack, M., Stricker, R. and Reiser, G. (2008). “Hetero-oligomerization of the P2Y<sub>11</sub> receptor with the P2Y<sub>1</sub> receptor controls the internalization and ligand selectivity of the P2Y<sub>11</sub> receptor.” *Biochem J* **409**(1): 107-16.
- Erb, L., Liao, Z., Seye, C. I. and Weisman, G. A. (2006). “P2 receptors: intracellular signaling.” *Pflugers Arch* **452**(5): 552-62.
- Faria, R. X., Defarias, F. P. and Alves, L. A. (2005). “Are second messengers crucial for opening the pore associated with P2X7 receptor?” *Am J Physiol Cell Physiol* **288**(2): C260-71.
- Garcia-Marcos, M., Perez-Andres, E., Tandel, S., Fontanils, U., Kumps, A., Kabre, E., Gomez-Munoz, A., Marino, A., Dehaye, J. P. and Pochet, S. (2006). “Coupling of two pools of P2X7 receptors to distinct intracellular signaling pathways in rat submandibular gland.” *J Lipid Res* **47**(4): 705-14.
- Gendron, F. P., Neary, J. T., Theiss, P. M., Sun, G. Y., Gonzalez, F. A. and Weisman, G. A. (2003). “Mechanisms of P2X7 receptor-mediated ERK1/2 phosphorylation in human astrocytoma cells.” *Am J Physiol Cell Physiol* **284**(2): C571-81.
- Giovannelli, A., Grassi, F., Mattei, E., Mileo, A. M. and Eusebi, F. (1991). “Acetylcholine induces voltage-independent increase of cytosolic calcium in mouse myotubes.” *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(22): 10069-73.
- Hardy, A. R., Jones, M. L., Mundell, S. J. and Poole, A. W. (2004). “Reciprocal cross-talk between P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>12</sub> receptors at the level of calcium signaling in human platelets.” *Blood* **104**(6): 1745-52.



- Hervas, C., Perez-Sen, R. and Miras-Portugal, M. T. (2003). "Coexpression of functional P2X and P2Y nucleotide receptors in single cerebellar granule cells." *J Neurosci Res* **73**(3): 384-99.
- Hervas, C., Perez-Sen, R. and Miras-Portugal, M. T. (2005). "Presence of diverse functional P2X receptors in rat cerebellar synaptic terminals." *Biochem Pharmacol* **70**(5): 770-85.
- Hollopeter, G., Jantzen, H. M., Vincent, D., Li, G., England, L., Ramakrishnan, V., Yang, R. B., Nurden, P., Nurden, A., Julius, D. and Conley, P. B. (2001). "Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs." *Nature* **409**(6817): 202-7.
- Jiang, L. H., Mackenzie, A. B., North, R. A. and Surprenant, A. (2000). "Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X(7) receptors." *Mol Pharmacol* **58**(1): 82-8.
- Jiang, L. H., Rassendren, F., Mackenzie, A., Zhang, Y. H., Surprenant, A. and North, R. A. (2005). "N-methyl-D-glucamine and propidium dyes utilize different permeation pathways at rat P2X(7) receptors." *Am J Physiol Cell Physiol* **289**(5): C1295-302.
- Jimenez, A. I., Castro, E., Communi, D., Boeynaems, J. M., Delicado, E. G. and Miras-Portugal, M. T. (2000). "Coexpression of several types of metabotropic nucleotide receptors in single cerebellar astrocytes." *J Neurochem* **75**(5): 2071-9.
- Jimenez, A. I., Castro, E., Mirabet, M., Franco, R., Delicado, E. G. and Miras-Portugal, M. T. (1999). "Potentiation of ATP calcium responses by A2B receptor stimulation and other signals coupled to Gs proteins in type-1 cerebellar astrocytes." *Glia* **26**(2): 119-28.
- Li, Q., Luo, X., Zeng, W. and Muallem, S. (2003). "Cell-specific behavior of P2X7 receptors in mouse parotid acinar and duct cells." *J Biol Chem* **278**(48): 47554-61.
- Liu, X., Surprenant, A., Mao, H. J., Roger, S., Xia, R., Bradley, H. and Jiang, L. H. (2008). "Identification of key residues coordinating functional inhibition of P2X7 receptors by zinc and copper." *Mol Pharmacol* **73**(1): 252-9.
- Marteau, F., Le Poul, E., Communi, D., Communi, D., Labouret, C., Savi, P., Boeynaems, J. M. and Gonzalez, N. S. (2003). "Pharmacological characterization of the human P2Y13 receptor." *Mol Pharmacol* **64**(1): 104-12.
- Mateo, J., Garcia-Lecea, M., Miras-Portugal, M. T. and Castro, E. (1998). "Ca<sup>2+</sup> signals mediated by P2X-type purinoceptors in cultured cerebellar Purkinje cells." *J Neurosci* **18**(5): 1704-12.
- Matthews, S., Iglesias, T., Cantrell, D. and Rozengurt, E. (1999). "Dynamic re-distribution of protein kinase D (PKD) as revealed by a GFP-PKD fusion protein: dissociation from PKD activation." *FEBS Lett* **457**(3): 515-21.
- North, R. A. (2002). "Molecular physiology of P2X receptors." *Physiol Rev* **82**(4): 1013-67.
- Panenka, W., Jijon, H., Herx, L. M., Armstrong, J. N., Feighan, D., Wei, T., Yong, V. W., Ransohoff, R. M. and MacVicar, B. A. (2001). "P2X7-like receptor activation in astrocytes increases chemokine monocyte chemoattractant protein-1 expression via mitogen-activated protein kinase." *J Neurosci* **21**(18): 7135-42.
- Pelegrin, P. and Surprenant, A. (2006). "Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor." *Embo J* **25**(21): 5071-82.
- Rodriguez-Moreno, A. and Lerma, J. (1998). "Kainate receptor modulation of GABA release involves a metabotropic function." *Neuron* **20**(6): 1211-8.
- Rozas, J. L., Paternain, A. V. and Lerma, J. (2003). "Noncanonical signaling by ionotropic kainate receptors." *Neuron* **39**(3): 543-53.
- Sanchez-Nogueiro, J., Marin-Garcia, P. and Miras-Portugal, M. T. (2005). "Characterization

- of a functional P2X(7)-like receptor in cerebellar granule neurons from P2X(7) knockout mice.” *FEBS Lett* **579**(17): 3783-8.
- Savi, P., Zacharyus, J. L., Delesque-Touchard, N., Labouret, C., Herve, C., Uzabiaga, M. F., Pereillo, J. M., Culouscou, J. M., Bono, F., Ferrara, P. and Herbert, J. M. (2006). “The active metabolite of Clopidogrel disrupts P2Y<sub>12</sub> receptor oligomers and partitions them out of lipid rafts.” *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(29): 11069-74.
- Simon, J., Filippov, A. K., Goransson, S., Wong, Y. H., Frelin, C., Michel, A. D., Brown, D. A. and Barnard, E. A. (2002). “Characterization and channel coupling of the P2Y<sub>12</sub> nucleotide receptor of brain capillary endothelial cells.” *J Biol Chem* **277**(35): 31390-400.
- Sorenson, E. M. and Gallagher, J. P. (1996). “The membrane hyperpolarization of rat dorsolateral septal nucleus neurons is mediated by a novel nicotinic receptor.” *J Pharmacol Exp Ther* **277**(3): 1733-43.
- Surprenant, A., Rassendren, F., Kawashima, E., North, R. A. and Buell, G. (1996). “The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X<sub>7</sub>).” *Science* **272**(5262): 735-8.
- Takasaki, J., Kamohara, M., Saito, T., Matsumoto, M., Matsumoto, S., Ohishi, T., Soga, T., Matsushime, H. and Furuichi, K. (2001). “Molecular cloning of the platelet P2T(AC) ADP receptor: pharmacological comparison with another ADP receptor, the P2Y<sub>1</sub> receptor.” *Mol Pharmacol* **60**(3): 432-9.
- Zhang, F. L., Luo, L., Gustafson, E., Lachowicz, J., Smith, M., Qiao, X., Liu, Y. H., Chen, G., Pramanik, B., Laz, T. M., Palmer, K., Bayne, M. and Monsma, F. J., Jr. (2001). “ADP is the cognate ligand for the orphan G protein-coupled receptor SP1999.” *J Biol Chem* **276**(11): 8608-15.





## **Introducción**



## 1.- EL SISTEMA PURINÉRGICO.

El ATP desempeña importantes funciones intracelulares. Se considera el elemento central del metabolismo energético y participa en numerosos procesos celulares, entre los que se encuentran la síntesis de macromoléculas o el mantenimiento de los gradientes iónicos de membrana. Además, es el precursor estructural de los ácidos nucleicos y regula la actividad de una gran diversidad de enzimas. Pero, el ATP, al igual que otros nucleótidos y nucleósidos, también están implicados en importantes funciones extracelulares.

Las primeras evidencias de la participación de las purinas en la señalización extracelular datan de principio del siglo pasado, cuando Drury y Szent-Gyorgyi (1929) demostraron que la adenosina y ácidos adenílicos (AMP, ADP y ATP) extraídos del músculo cardíaco, producían diversos efectos biológicos como la dilatación arterial o la disminución de la presión sanguínea. Poco después, se sospechó que la adenosina y el ATP debían actuar a través de receptores diferentes (Gillespie, 1934). Más adelante, se describieron las acciones extracelulares de estos compuestos en otros tejidos, destacando sus efectos sobre la motilidad intestinal y la contracción uterina (Deuticke, 1932; Berne, 1963).

Las acciones del ATP pronto se extendieron al sistema nervioso. En los años cincuenta, el grupo de Holton propuso al ATP como la sustancia vasodilatadora que se liberaba tras la estimulación de los nervios sensoriales del conejo (Holton y Holton, 1953; Holton y Holton, 1954; Holton, 1959). Al principio de la década de los 60, se detectaron en el sistema nervioso autónomo respuestas postsinápticas en presencia de antagonistas colinérgicos y adrenérgicos, lo que llevó a postular la existencia de nervios no-adrenérgicos no-colinérgicos (NANC). Posteriormente, Burnstock propuso que dicho efector era el ATP, acuñando el nombre de nervios purinérgicos y sugiriendo la existencia de una neurotransmisión purinérgica (Burnstock y cols., 1970; Burnstock, 1972). Durante mucho tiempo, estos conceptos no fueron plenamente aceptados. Sin embargo, en los años siguientes, fueron acumulándose evidencias que apoyaban esta hipótesis.

Para que un compuesto sea considerado un neurotransmisor, es necesario que sea sintetizado por las neuronas, que se almacene en vesículas de secreción y se libere por exocitosis en respuesta a un estímulo eléctrico. Una vez en el medio extracelular, debe interactuar con receptores específicos de membrana y cuando finaliza su acción tiene que ser eliminado de la hendidura sináptica mediante su recaptación o a través de su degradación. Como se mostrará a continuación, el ATP y otros nucleótidos cumplen todos estos requisitos.

En los años 70 surgió el concepto de cotransmisión, según el cual una misma célula nerviosa podía almacenar y liberar más de un tipo de neurotransmisor. De acuerdo con esta idea, se comprobó que el ATP podía ser coalmacenado y coliberado junto adrenalina o acetilcolina (Burnstock, 1976). Posteriormente, se identificaron otros nucleótidos y compuestos relacionados que también se almacenaban en vesículas secretoras. Entre ellos, se encuentran los diadenosina polifosfatos ( $Ap_nA$ ,  $n=4-6$ ), que inicialmente se detectaron en los gránulos cromafines junto con el ATP y otros neurotransmisores (Rodríguez del Castillo

y cols., 1988; Pintor y cols., 1991; Pintor y cols., 1992a). El almacenamiento de estas moléculas en los gránulos de secreción, requiere un sistema de transporte eficaz al interior de los gránulos en contra de gradiente de concentración, los transportadores vesiculares. El transporte de los nucleótidos y de los diadenosina polifosfato, se realiza a través del mismo transportador vesicular, todavía no clonado, que posee una baja especificidad lo que permite la acumulación todos los nucleótidos di- y tri- fosfatos en el interior de los gránulos (Gualix y cols., 1997; Gualix y cols., 1999). Los nucleótidos y dinucleótidos también se han detectado coalmacenados con serotonina en los gránulos densos de las plaquetas y con histamina en los mastocitos y en los basófilos (Luthje y Ogilvie, 1983; Dubyak y el-Moatassim, 1993).

La presencia del ATP y de los dinucleótidos en vesículas sinápticas del sistema nervioso, se describió por primera vez en las vesículas colinérgicas del órgano eléctrico del pez *Torpedo marmorata* (Dowdall y cols., 1974; Zimmermann y Denston, 1976; Zimmermann, 1978; Pintor y cols., 1992b). Posteriormente, se confirmó la presencia de estos compuestos en vesículas de almacenamiento de terminaciones presinápticas de sistema nervioso central de naturaleza colinérgica y noradrenérgica. En los últimos años, se ha llegado a postular que el ATP se podría coliberar de terminaciones GABAérgicas y glutamatérgicas (Jo y Schlichter, 1999; Mori y cols., 2001), en las cuales también se han identificado receptores específicos de nucleótidos que modulan la liberación de estos neurotransmisores, como se describirá más adelante. La concentración de ATP en la hendidura sináptica, tras la liberación desde terminaciones nerviosas, podría alcanzar valores de 100  $\mu\text{M}$  (Richardson y Brown, 1987).

Los primeros trabajos que demostraron que el ATP actuaba en el sistema nervioso central como neurotransmisor excitatorio rápido en neuronas, se realizaron a principios de la década de los 90 (Edwards y cols., 1992; Silinsky y cols., 1992; Evans y cols., 1992; Edwards y Gibb, 1993). Se demostró que el ATP mediaba corrientes postsinápticas excitatorias en cortes de habénula medial, hipocampo y médula espinal (Edwards y cols., 1992; Bardoni y cols., 1997; Pankratov y cols., 1998). De hecho, este nucleótido está implicado en la transmisión de dolor y sensaciones propioceptivas (Chen y cols., 1995; Kennedy y Leff, 1995; Salter y cols., 1993).

Otro de los aspectos importantes de los nucleótidos en la transmisión nerviosa es la regulación que ejerce el ATP y los diadenosina polifosfato sobre la liberación de glutamato, acetilcolina y GABA desde terminaciones sinápticas aisladas de cerebro medio de rata (Gomez-Villafuertes y cols., 2001; Diaz-Hernandez y cols., 2002; Gualix y cols., 2003).

Actualmente, no existe ninguna duda sobre la existencia de la señalización purinérgica en prácticamente todos los tejidos y sistemas del organismo donde regulan numerosas funciones, con efectos a largo y a corto plazo, entre los que se encuentran la secreción endocrina y exocrina, respuesta inmune, inflamación, transducción mecanosensorial, agregación plaquetaria, vasodilatación, proliferación, diferenciación, migración y muerte celular (Abbracchio y Burnstock, 1998; Burnstock y Knight, 2004).

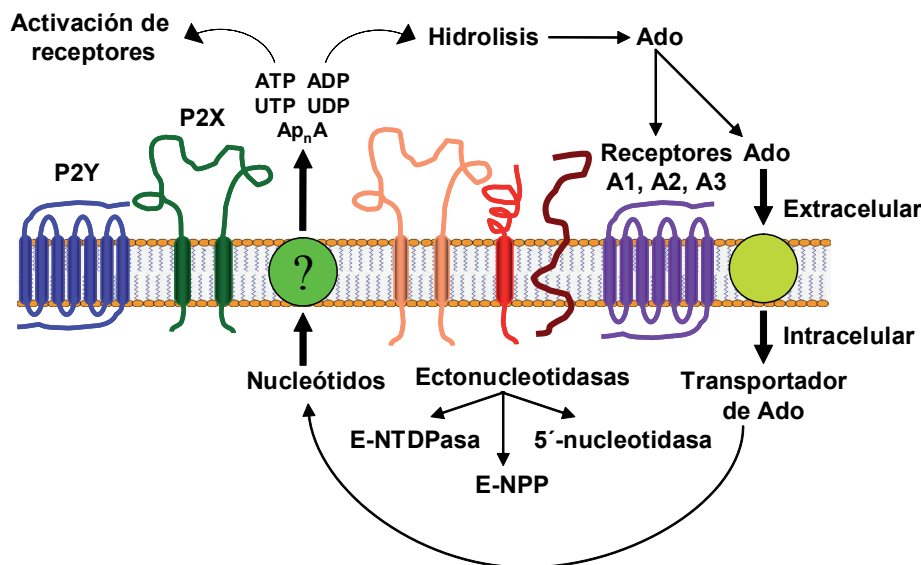
### **1.1.- Liberación y degradación de los nucleótidos.**

Además de la liberación exocitótica de nucleótidos, ampliamente caracterizada en los tejidos neurales y neurosecretores, otros muchos tipos celulares como las células endoteliales, musculares y gliales liberan ATP y otros nucleótidos en respuesta a diferentes estímulos, como estrés mecánico, hipoxia, inflamación o a determinados agonistas (Bodin y Burnstock, 2001). Un simple daño o rotura tisular, dadas las elevadas concentraciones de nucleótidos presentes en el citoplasma (rango mM), puede incrementar notablemente los niveles extracelulares de nucleótidos hasta alcanzar concentraciones milimolares. Esta salida masiva de ATP puede ser muy importante en la regulación de numerosos procesos, por ejemplo, en el hipotálamo está implicada en la regulación de la ingesta de comida, la secreción hormonal, la actividad cardiovascular, el sueño, procesos febriles, etc. (Gourine y cols., 2007).

Sin embargo, los mecanismos implicados en la liberación no exocitótica de ATP no están totalmente aclarados. En células epiteliales y en otras células sometidas a estrés mecánico u osmótico, se ha propuesto que la salida de ATP de la célula podría estar mediada por transportadores de la familia de proteínas ABC (ATP-binding cassette). Algunos de sus miembros son la glicoproteína P o ABCB1 y la proteína CFTR (Cystic fibrosis transmembrane regulator) o ABCB7 (Abraham y cols., 1993; Reisin y cols., 1994; Schwiebert y cols., 1995). Aunque, hasta el momento, sólo se ha confirmado que las proteínas ABCC4 (MRP<sub>4</sub>) y ABCC5 (MRP<sub>5</sub>) están implicadas en el transporte al exterior celular de los nucleótidos cíclicos cAMP y cGMP. Otras hipótesis sugieren la participación de diferentes moléculas como canales aniónicos dependientes de voltaje o las conexinas (Buettner y cols., 2000; Coco y cols., 2003; Zhao y cols., 2005; Bahima y cols., 2006; Eltzschig y cols., 2006). Algunos autores descartan la participación de las conexinas en la liberación del ATP, señalando que los bloqueantes de los hemicanales formados por estas proteínas, actúan como antagonistas del receptor P2X<sub>7</sub>. En estos trabajos, se propone que el receptor P2X<sub>7</sub> contribuye a la salida de ATP de los astrocitos y a la propagación de las ondas de calcio (Suadicani y cols., 2006). Diversos grupos apoyan la hipótesis de que las panexinas, moléculas que al igual que las conexinas pueden formar hemicanales, podrían mediar la liberación de ATP (Dahl y Locovei, 2006; Barbe y cols., 2006; Locovei y cols., 2006).

Los mecanismos por los cuales se puede inactivar o disminuir la señalización inducida por un mensajero extracelular, incluyen la desensibilización o disminución del número de receptores, así como la retirada del mensajero del medio extracelular. Los nucleótidos se degradan mediante una cascada de enzimas extracelulares que conducen a la formación del nucleósido correspondiente y de fosfato, que posteriormente pueden ser reutilizados por las células adyacentes para la síntesis de nucleótidos. En el caso de los nucleótidos de adenina, la adenosina resultante puede actuar a través de sus propios receptores (Figura 1).





**Figura 1.- Esquema de la liberación, metabolismo de los nucleótidos y activación de los receptores purinérgicos y de adenosina.** Los nucleótidos son liberados al espacio extracelular, donde pueden actuar sobre receptores específicos (P2Y o P2X) presentes en la membrana plasmática de las células. Su acción finaliza mediante su hidrólisis por ectonucleotidasas. El producto final es la adenosina (Ado) que puede actuar a través de sus propios receptores (A1, A2, A3) y ser recaptada por las células que la emplean en la síntesis de nucleótidos.

Las ectoenzimas capaces de hidrolizar al ATP y a otros nucleótidos, se denominan ectonucleotidasas (Zimmermann, 2000). Estas enzimas se encuentran unidas a la membrana plasmática con su centro catalítico orientado al medio extracelular, aunque también existen isoformas solubles denominadas exonucleotidasas.

Las ectonucleotidasas presentan una amplia distribución tisular y suelen actuar de manera concertada o consecutiva, de manera que la degradación secuencial de los nucleótidos, no sólo acaba con su señalización, sino que también genera intermediarios, que en este caso siguen siendo moléculas activas capaces de interaccionar con otros tipos de receptores (tabla 1). Las ectoenzimas se clasifican en cuatro familias:

#### 1.- Familia de las E-NTPDasas (Ecto-nucleótidotrifosfo y difosfohidrolasas)

Estas enzimas hidrolizan nucleótidos tri- y di-fosfato. De los ocho miembros de la familia, únicamente las NTPDasa1, NTPDasa2, NTPDasa3 y NTPDasa8 parecen desempeñar un papel relevante en el control de la señalización mediada por los receptores purinérgicos, ya que se encuentran en la membrana plasmática e hidrolizan nucleótidos en el rango de concentraciones a las que activan sus receptores (Kukulski y cols., 2005).

#### 2.- Familia de las E-NPP (Ecto-fosfodiesterasas). Esta familia, que consta

de siete miembros, ha recibido numerosas denominaciones, la nomenclatura actual fue propuesta por Zimmermann en el año 2000. Estas enzimas catalizan la ruptura de los enlaces fosfodiéster, pero sólo las E-NPP 1-3 están implicadas en la degradación de nucleótidos y

pueden hidrolizar ATP generando AMP y PPi (Zimmermann, 2000). Otras moléculas, que pueden ser sustratos de estos subtipos de E-NPP, son los diadenosina polifosfato, coenzimas con componentes nucleotídicos como el NAD<sup>+</sup> y lisofosfolípidos (Umezú-Goto y cols., 2002; Tokumura y cols., 2002).

3.- Ecto-5'-nucleotidasa. Cataliza la etapa final de degradación de los nucleótidos monofosfato, generando el correspondiente nucleósido y fosfato inorgánico. Es por tanto, la principal responsable de la formación de adenosina a partir de ATP y ADP.

4.-Fosfatasa alcalina. Esta familia está formada por ecto-fosfomonoesterasas que liberan fosfato inorgánico de una gran variedad de compuestos orgánicos, entre los que se encuentran los nucleótidos tri-, di- y monofosfatos (Zimmermann, 2000). Además, también pueden hidrolizar PPi y catalizar la reacción de transfosforilación en presencia de altas concentraciones de aceptores de fosfato.

Ectonucleotidasa	Reacción catalizada
<i>Familia de las E-NTPDasas</i> E-NTPDasa-1  E-NTPDasa-2  E-NTPDasa-3	$ATP \rightarrow ADP + P_i$ $ADP \rightarrow AMP + P_i$  $ATP \rightarrow ADP + P_i$  $ATP \rightarrow ADP + P_i$ $ATP \rightarrow AMP + PP_i$
<i>Familia de las NPPasas</i> NPP1-3	$ATP \rightarrow ADP + P_i$ $ATP \rightarrow AMP + PP_i$ $ADP \rightarrow AMP + P_i$ $Ap_nA \rightarrow Ap_{n-1}A + AMP$
<i>Ecto-5'-nucleotidasa</i>	$AMP \rightarrow Ado + P_i$
<i>Ecto-fosfatasa alcalina</i>	$ATP \rightarrow ADP \rightarrow AMP \rightarrow Ado + 3 P_i$

**Tabla 1.- Familias de ectonucleotidasas.** Los datos han sido obtenidos de las revisiones publicadas por Stefan y cols. (2006) y Robson y cols., (2006) en Purinergic Signalling.

Existen otras enzimas que participan en el metabolismo de los nucleótidos catalizando la interconversión entre ellos. Algunos ejemplos son la ecto-nucleosidodifosfoquinasa, que interconvierte nucleótidos di- y tri-fosfatos, la ecto-ATP:AMP-fosfotransferasa (mioquinasa), que genera dos moléculas de ADP a partir de ATP y AMP y viceversa, o la ecto-proteína quinasa que fosforila proteínas extracelulares utilizando ATP como cosustrato y catalizan su ADP ribosilación a partir de NAD<sup>+</sup> (Zimmermann, 2000).

### **1.2.- Receptores de nucleótidos.**

Como ya se ha comentado, la adenosina y los nucleótidos median numerosos efectos biológicos actuando a través de receptores específicos de membrana, denominados receptores purinérgicos. En 1978, Burnstock propuso la primera clasificación de estos receptores en dos familias, los receptores de adenosina o receptores P1 y los receptores de ATP o receptores P2, atendiendo a criterios farmacológicos, al efecto de la adenosina sobre la adenilato ciclasa y del ADP y ATP sobre la síntesis de prostaglandinas.

Los receptores P2 se clasificaron, a su vez, en dos subfamilias, los receptores P2X y los receptores P2Y (Burnstock y Kennedy, 1985). Los primeros eran activados de manera muy potente por  $\alpha,\beta$ meATP y  $\beta,\gamma$ meATP, mientras que el agonista más potente de los receptores P2Y era el 2MeSATP. Además, los receptores P2X, a diferencia de los receptores P2Y, se desensibilizaban muy rápidamente en presencia del agonista.

Posteriormente, se describieron otros receptores P2 que no se adaptaban a la clasificación anterior. Así, en 1986 Gordon describió el receptor P2T de las plaquetas, específico para ADP, que se bloqueaba por ATP, y el receptor P2Z de macrófagos que se activaba preferentemente por ATP<sup>4+</sup> y se bloqueaba por oATP (periyodato-oxidado ATP) (Gordon, 1986; Murgia y cols., 1993). Mientras que al receptor que se activaba de manera equipotente por ATP y UTP, se le denominó receptor P2U (O'Connor y cols., 1991). Poco después, se identificó un receptor de alta afinidad para los diadenosina polifosfatos denominado P2D (Pintor y Miras-Portugal, 1995).

Hoy en día, en base a diferencias en su estructura y en los mecanismos de transducción de señal, los receptores P2 se dividen en dos grandes familias, los receptores P2X, que son canales iónicos activados por ligando, y los receptores P2Y, que son receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G (Ralevic y Burnstock, 1998).

La caracterización de los receptores P2 no es sencilla, debido principalmente a la falta de agonistas y antagonistas específicos. De este modo, se ha comprobado que el 2MeSATP, inicialmente utilizado para definir respuestas mediadas por receptores P2Y, también es agonista de muchos subtipos de receptores P2X. Por otro lado, algunos subtipos de receptores P2X expresados heterológicamente no son sensibles a  $\alpha,\beta$ meATP. Además, aquellos receptores activados por este agonista poseen unas características muy similares y es difícil diferenciarlos. Existen diversos compuestos que se han utilizado como antagonistas de los receptores P2X y P2Y durante décadas. Entre los más empleados destacan PPADS (ácido piridoxalfosfato-

6-azofenil-2',4'-disulfónico), suramina y azul reactivo 2 (Lambrecht y cols., 1992; Dunn y Blakeley, 1988). Sin embargo, estos compuestos tampoco discriminan entre los diferentes subtipos de receptores P2X o P2Y, identificados posteriormente. Afortunadamente, como se comentará en los apartados dedicados a las dos familias de receptores de nucleótidos, en los últimos años se han realizado numerosos esfuerzos en el diseño de nuevas herramientas farmacológicas más selectivas, que permiten dicha diferenciación.

Otra de las dificultades que surge en la caracterización de los receptores de nucleótidos, es la coexpresión de diferentes subtipos en un mismo tejido o línea celular, por lo que el perfil farmacológico observado, en la mayoría de los casos, no se corresponde con el descrito para los receptores expresados de forma heteróloga. Además, debido a la acción de las ectoenzimas que pueden estar presentes en la misma célula o células adyacentes, se pueden originar compuestos que actúan sobre otros receptores presentes en el mismo tejido.

Por todo ello, aunque en los tejidos nativos se ha conseguido identificar análogos de algunos receptores P2 clonados, basándose en la distribución, farmacología y mecanismos de transducción de señal, en la mayoría de los casos no ha sido posible establecer una correlación inequívoca. Por ello, normalmente los receptores endógenos se nombran con el sufijo -like, por ejemplo, "P2Y<sub>13</sub>-like" o "P2X<sub>7</sub>-like", hasta que se apliquen criterios posteriores que corroboren su identificación.

### **1.3.- Receptores ionotrópicos P2X.**

Los receptores P2X son canales iónicos activados por ligando, con permeabilidad selectiva para cationes de pequeño tamaño (Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>), que se activan por la unión de ATP extracelular (North, 2002). Estos receptores se expresan abundantemente en células excitables y no excitables, como es el caso de células de músculo liso, neuronas, células gliales, células del sistema inmune o plaquetas, por lo que intervienen en numerosos procesos desde la transmisión rápida excitatoria en el sistema nervioso central y periférico hasta la coagulación sanguínea.

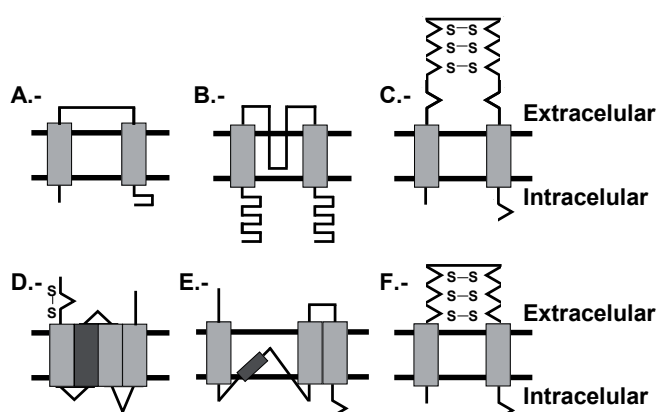
Desde la década de los noventa, se han clonado siete subunidades P2X diferentes (P2X<sub>1-7</sub>), con un tamaño comprendido entre 388 (P2X<sub>4</sub>) y 595 (P2X<sub>7</sub>) aminoácidos con un 40-50% de homología en la secuencia. El receptor P2X<sub>4</sub> es el que presenta mayor similitud con el resto de miembros de esta familia, siendo el receptor P2X<sub>7</sub> el más diferente. Se ha descrito la existencia de ortólogos en diferentes especies de vertebrados, pero no se ha detectado la presencia de secuencias homólogas en invertebrados, aunque hay evidencias funcionales de que en estos organismos ATP y otros nucleótidos podrían activar canales activados por ligandos.

Se han identificado y localizado los siete genes que codifican las diferentes subunidades P2X. Los genes de las subunidades P2X<sub>4</sub> y P2X<sub>7</sub> se localizan en el mismo cromosoma, concretamente en el brazo largo del cromosoma 12 humano, muy próximos entre sí y del gen que codifica para la calmodulina quinasa II. Los genes de las subunidades P2X<sub>1</sub> y P2X<sub>5</sub>

también se encuentran muy cercanos y próximos al gen del receptor de vanilloide en el brazo corto del cromosoma 13. Los genes del resto de subunidades se localizan en cromosomas diferentes. El tamaño de estos genes es variable, la forma completa está formada por 11-13 exones con una estructura común y con límites intrón/exón muy conservados. La diversidad de esta familia se ha incrementado con la identificación de nuevas isoformas. Por ejemplo, se han detectado varias isoformas de la subunidad P2X<sub>2</sub> que son el resultado del procesamiento diferencial o alternativo de su pre-ARNm en el cerebelo de rata, en la cóclea y en la pituitaria (Simon y cols., 1997; Housley y cols., 1998; Lynch y cols., 1999). Asimismo, se han identificado varias isoformas de los receptores P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>5</sub> y P2X<sub>7</sub> (Le y cols., 1997; Dhulipala y cols., 1998; Hardy y cols., 2000; Denlinger y cols., 2005; Gu y cols., 2004; Sellick y cols., 2004). Aunque la mayoría de estas variantes no son capaces de formar canales funcionales por sí mismas, su coexpresión con otras subunidades puede generar un fenotipo diferente, lo que contribuye a explicar la gran heterogeneidad de los receptores P2X observada *in vivo* y algunas de las diferencias que se han encontrado entre los receptores endógenos y los expresados de forma heteróloga, como ocurre con el receptor P2X<sub>4</sub> de ratón (Townsend-Nicholson y cols., 1999).

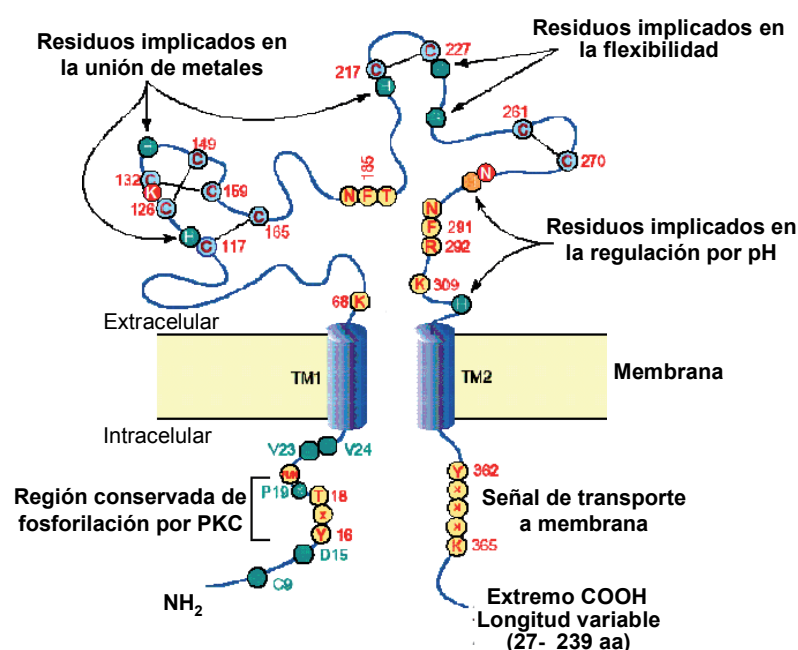
### 1.3.1.- Estructura y topología transmembrana de las subunidades P2X.

Es importante señalar que las proteínas P2X aisladas no constituyen un canal iónico. Al igual que ocurre con otros canales iónicos activados por ligando, es necesario que se produzca el coensamblaje de varias subunidades para que se forme el receptor funcional. Sin embargo, su estructura y topología de membrana difieren enormemente de las que presentan las subunidades del resto de receptores ionotrópicos, ya que únicamente poseen dos dominios transmembrana (TM1 y TM2) con los extremos amino y carboxilo terminal en el interior celular. Esta topología es similar a la de otros canales iónicos, como el canal de Na<sup>+</sup> epitelial y el canal rectificador de K<sup>+</sup> (figura 2).

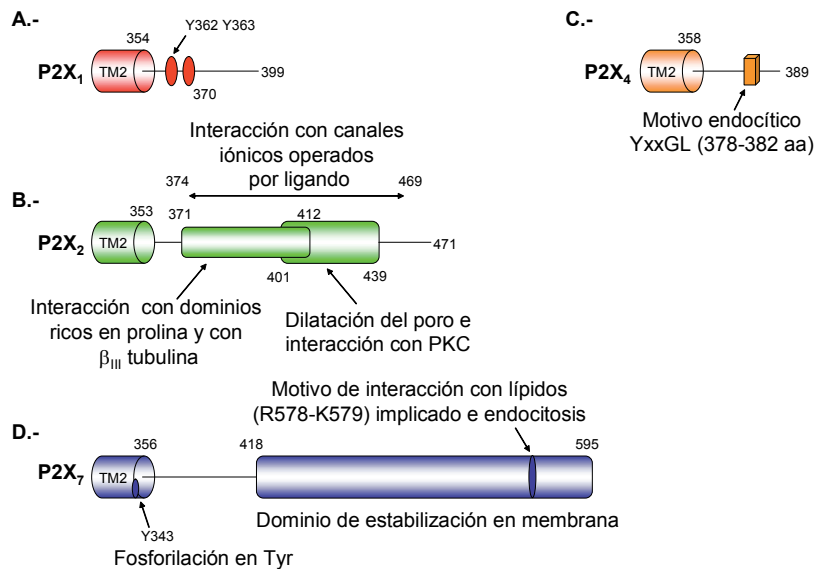


**Figura 2.- Esquema de la topología de las subunidades P2X.-** Comparación con las subunidades de otros canales iónicos. **A.-** Canal mecanosensible de *E. Coli*. **B.-** Canal rectificador anómalo de K<sup>+</sup>. **C.-** Canal epitelial de Na<sup>+</sup>. **D.-** Subunidad de la superfamilia del receptor nicotínico de acetilcolina. **E.-** Subunidad de la superfamilia del receptor ionotrópico de glutamato. **F.-** Subunidad de los receptores P2X.

La figura 3, muestra un esquema más detallado de la estructura de las subunidades P2X. El extremo amino terminal está bastante conservado y tiene una longitud variable de 24-31 aminoácidos. Los dos segmentos transmembrana se extienden desde los residuos 30 al 50 y desde el 330 al 353, respectivamente. Ambos dominios están separados por una voluminosa región extracelular donde se encuentran la mayoría de residuos conservados entre los distintos subtipos de subunidades P2X. Finalmente, el extremo carboxilo terminal es el que mayor diversidad presenta tanto en su secuencia como en su longitud (figura 4). Su tamaño oscila entre los 27 aminoácidos en el caso del receptor P2X<sub>6</sub> a los 239 del receptor P2X<sub>7</sub>, que posee un dominio hidrofóbico adicional. Esta variabilidad sugiere que el extremo C-terminal podría conferir propiedades específicas a cada receptor.



**Figura 3.- Representación de la estructura de la subunidad P2X<sub>1</sub>.** Se muestran los dominios intracelulares N-terminal y C-terminal, las regiones transmembrana (TM1 y TM2) y el dominio extracelular. En rojo se señalan los aminoácidos conservados y en blanco sobre fondo verde o naranja los residuos identificados mediante mutagénesis dirigida de los receptores P2X<sub>2</sub> y P2X<sub>4</sub>, respectivamente. En el extremo N-terminal, existe un motivo de fosforilación por PKC y diversos residuos (en verde) implicados en la respuesta a ATP. En el bucle extracelular, los residuos K68, R292 y K309, interaccionan con los grupos fosfatos del ATP y los residuos F185 y F291 se unen al anillo de adenina. En la regulación por metales, están implicados dos puentes disulfuros y dos residuos de histidina. Estos últimos, al igual que las histidinas próximas a TM2 que regulan el efecto del pH, no se conservan en todos los receptores P2X. En C-terminal aparece un motivo conservado implicado en el transporte del receptor a membrana. Los aminoácidos P225 y G247 permiten los cambios conformacionales que se producen al unirse el ligando. La figura está basada en la publicada en Trends in Pharmacological Sciences por Vial y cols. (2004). En rojo se han marcado los residuos Lys<sup>127</sup> (K) y Arg<sup>284</sup> (R) del receptor P2X<sub>7</sub> implicados en el reconocimiento del ligando (Young y cols., 2007).



**Figura 4.- Diversidad y funcionalidad del dominio C-terminal de las subunidades P2X.** Representación del dominio TM2 y del extremo C-terminal de los receptores P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>4</sub> y P2X<sub>7</sub>. Se indican las regiones o residuos que son importantes en su función. La figura está basada en la mostrada en Trends in Pharmacological Sciences por Vial y cols (2004).

Dentro del dominio extracelular se encuentran 10 residuos de cisteína altamente conservados que podrían contribuir a la estabilización de la estructura terciaria de la proteína mediante la formación de puentes disulfuro. Seis de estos residuos se localizan en la primera mitad del dominio extracelular, que estaría codificada por los exones 2, 4 y 5, y los cuatro restantes en la segunda mitad del mismo que correspondería a los exones 7 y 8. Mediante diferentes estudios de sustitución de residuos de cisteína por alanina se han identificado alguna de las parejas de cisteína que forman puentes disulfuro, así como residuos que pueden interaccionar de forma promiscua, como ocurre, en el caso de la subunidad P2X<sub>2</sub>, con los residuos Cys<sup>124</sup>, Cys<sup>130</sup>, Cys<sup>147</sup> y Cys<sup>158</sup>, sugiriendo que se encuentran próximos entre sí (Clyne y cols., 2002b). En el caso del receptor P2X<sub>1</sub> humano la ruptura de los puentes disulfuro entre los residuos Cys<sup>261</sup>-Cys<sup>270</sup> y Cys<sup>117</sup>-Cys<sup>165</sup> disminuye el transporte del receptor a la membrana plasmática (Ennion y Evans, 2002).

El dominio extracelular presenta también varias secuencias consenso de N-glicosilación (Asn-X-Ser/Thr) que son esenciales para la localización de la proteína en la superficie celular. La subunidad P2X<sub>1</sub> posee cinco de estas secuencias, cuatro de las cuales están conservadas en humano, rata y ratón (Nicke y cols., 1998). En la subunidad P2X<sub>2</sub> se han identificado tres secuencias de glicosilación (Newbolt y cols., 1998; Torres y cols., 1998b). Los receptores que presentan dos secuencias glicosiladas se expresan en la membrana y son completamente funcionales, mientras que aquellos que sólo tienen una secuencia o no están glicosilados quedan retenidos en el interior celular y apenas son funcionales. El resto de subunidades



P2X también poseen secuencias susceptibles de N-glicosilación que se encuentran altamente conservadas entre especies pero varían en función del tipo de subunidad.

En la unión del ligando participan tanto el dominio extracelular como los dos segmentos transmembrana, tal y como lo demuestran numerosos estudios realizados con receptores quimera y ensayos de mutagénesis dirigida. El ATP podría interaccionar con residuos cargados positivamente, Lys<sup>68</sup>, Arg<sup>292</sup> y Lys<sup>309</sup> (referidos a P2X<sub>1</sub>), situados cerca de los dominios TM1 y TM2 (Ennion y cols., 2000). Además, los residuos aromáticos Phe<sup>185</sup> y Phe<sup>291</sup> contribuyen a coordinar el anillo de la adenina, la mutación de residuos adyacentes altamente conservados también afectan a la potencia del agonista (Roberts y Evans, 2004). Teniendo en cuenta que el ATP generalmente está complejado con iones magnesio se ha sugerido que también podría interaccionar con residuos del receptor cargados negativamente. Sin embargo mediante experimentos de mutagénesis dirigida con las subunidades P2X<sub>1</sub> y P2X<sub>2</sub> se ha descartado que estos residuos sean esenciales para la unión del agonista (Jiang y cols., 2000a; Ennion y cols., 2001). No obstante, existen diferencias entre las propiedades de los diferentes receptores. Así la mutación de un residuo conservado de aspartato (Asp262Ala) no afecta a la potencia del ATP en el receptor P2X<sub>1</sub> pero sí que disminuye 50 veces su potencia en el caso del receptor P2X<sub>2</sub>. Se considera que la unión del ligando induce una serie cambios conformacionales en el receptor estabilizando la unión del ATP de alta afinidad, residuos de glicina y prolina altamente conservados en las proximidades del segmento TM2 parece que proporcionan una mayor flexibilidad facilitando estos cambios conformacionales (Nakazawa y Ohno, 1999; Nakazawa y cols., 2004). Se ha postulado que la razón por la que la adenina y otros nucleótidos difosfato son inactivos sobre estos receptores radica en que son incapaces de estabilizar dichos cambios conformacionales (Roberts y Evans, 2004).

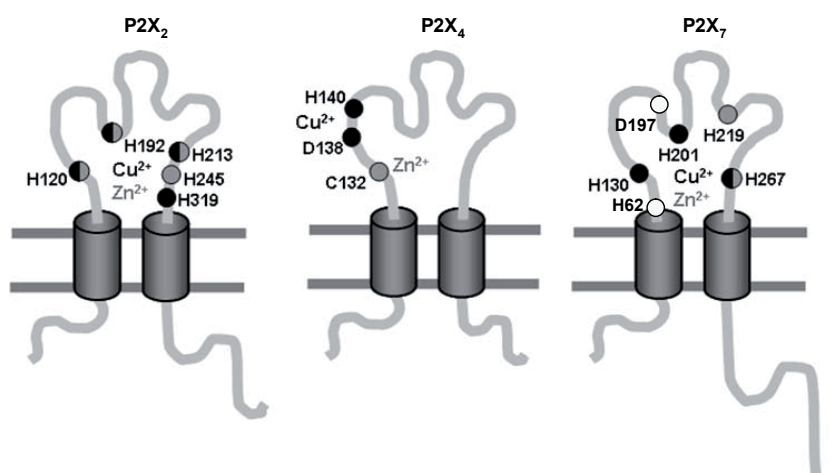
La presencia de protones, iones divalentes y metales en el medio extracelular modifica la actividad de los receptores P2X, aunque el efecto varía dependiendo del tipo de subunidad (tabla 2). En el caso de los receptores P2X<sub>2</sub> y P2X<sub>4</sub> el efecto del pH parece estar mediado por residuos de histidina próximos a los sitios de unión del ATP, His<sup>319</sup> y His<sup>286</sup>, respectivamente (Clyne y cols., 2002a; Clarke y cols., 2000). Estos dos receptores son, junto con el receptor P2X<sub>7</sub>, los más sensibles a la regulación por iones. En la figura 5 se muestran los residuos de los receptores P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>4</sub> y P2X<sub>7</sub> implicados dicha modulación. La actividad del receptor P2X<sub>2</sub> se potencia cooperativamente por Cu<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup>, en esta regulación participan las histidinas His<sup>120</sup> e His<sup>213</sup> (Clyne y cols., 2002a; Lorca y cols., 2005). Recientemente, se ha demostrado que ambos residuos están próximos entre sí, localizados en la interfase de las subunidades del trímero, formando un sitio de unión de metales (Nagaya y cols., 2005). Los iones Zn<sup>2+</sup> y el Cu<sup>2+</sup> tienen efectos opuestos sobre el receptor P2X<sub>4</sub> (Acuna-Castillo y cols., 2000). El Cu<sup>2+</sup> ejerce un efecto inhibitorio que parece estar mediado por la His<sup>140</sup> (Coddou y cols., 2003), mientras que el Zn<sup>2+</sup> tiene un efecto bifásico sobre la actividad del receptor. A bajas concentraciones la potencia y a altas la inhibe. Este comportamiento, ha llevado a sugerir que en el receptor P2X<sub>4</sub> existen dos sitios de unión a metales. Uno de ellos, que



Receptor	EC <sub>50</sub> (ATP)	Agonistas	Antagonista	Regulación por iones	Desensibilización	Distribución
rP2X <sub>1</sub>	0,1 μM	ATP = 2MeSATP ≥ α,β-meATP > BzATP	NF449 > TNP-ATP > IP <sub>5</sub> I (nM)	Zn <sup>2+</sup> ↓	Rápida	Músculo liso, plaquetas, cerebelo, asta dorsal, neuronas de médula espinal
rP2X <sub>2</sub>	5 μM	ATP ≥ 2MeSATP=ATPyS αβ-meATP y ADP inactivos	RB2 = NF279 > BBG = TNP-ATP = PPADS > Suramina (μM)	H <sup>+</sup> ↑ Zn <sup>2+</sup> ↑ Cu <sup>2+</sup> ↑	Lenta	Músculo liso, SNC, retina, célula cromafín, ganglios sensoriales
rP2X <sub>3</sub>	1,3 μM	2MeSATP > ATP = ATPyS > α,β-meATP ≥ Ap <sub>5</sub> A	TNP-ATP (nM) > PPADS (μM) > NF279 = NF449 = Ip <sub>5</sub> I = Suramina	Zn <sup>2+</sup> ↑	Rápida	Neuronas sensoriales, algunas neuronas simpáticas
rP2X <sub>4</sub>	4 μM	ATP > 2MeSATP = CTP α,β-meATP inactivo Potenciado por Ivermectina	TNP-ATP (μM) > BBG (μM) Insensible a PPADS	H <sup>+</sup> ↓ Zn <sup>2+</sup> ↑ ↓ Cu <sup>2+</sup> ↓	Lenta	SNC, testículo, colon
rP2X <sub>5</sub>	0,4 μM	ATP = 2MeSATP = ATPyS > α,β-meATP > BzATP	PPADS > TNP-ATP > Suramina (μM)	Zn <sup>2+</sup> ↑	Lenta	Células proliferativas de la piel, intestino, vejiga, timo, médula espinal, SNC, médula espinal
rP2X <sub>6</sub>	0,6 μM	2MeSATP > ATP			Lenta	SNC, motoneuronas de médula espinal.
rP2X <sub>7</sub>	400 μM	BzATP = 2MeSATP > ATP α,β-meATP inactivo	BBG (nM) > αATP (μM) > PPADS = TNP-ATP	Zn <sup>2+</sup> ↓ Cu <sup>2+</sup> ↓ Mg <sup>2+</sup> ↓	Lenta	Células del sistema inmune, páncreas, piel, osteoclastos

**Tabla 2.- Clasificación de los receptores P2X homoméricos.** Los datos han sido obtenidos de las revisiones escritas por King y Townsend-Nicholson (2003), Burnstock (2007), Egan y cols. (2006) y Roberts y cols. (2006).

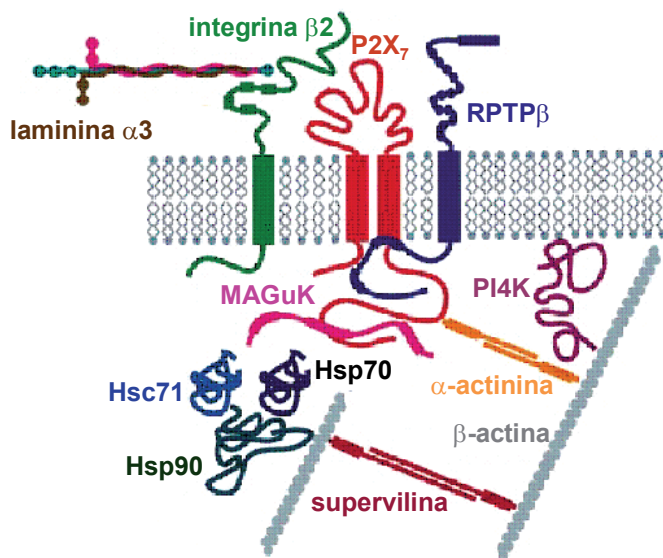
media el efecto inhibitorio, une  $\text{Cu}^{2+}$  con alta afinidad y  $\text{Zn}^{2+}$  a concentraciones elevadas, mientras que el otro sitio de unión es el responsable de la potenciación ejercida por el  $\text{Zn}^{2+}$ . Estudios recientes han identificado algunos de los residuos que forman parte de cada uno de dichos sitios de regulación alostérica. La  $\text{Cys}^{132}$ , próxima a la  $\text{His}^{140}$ , se encuentra en el sitio potenciador y el  $\text{Asp}^{138}$  se localiza en el sitio inhibitorio (Coddou y cols., 2007). Es posible que el receptor  $\text{P2X}_4$  posea un tercer sitio de unión a metales ya que se ha demostrado que el mercurio ejerce un efecto inhibitorio en el que no está involucrada la  $\text{His}^{140}$  (Coddou y cols., 2005). La actividad del receptor  $\text{P2X}_7$  es inhibida tanto por  $\text{Zn}^{2+}$  como por  $\text{Cu}^{2+}$ , este efecto está mediado por la interacción de los iones con residuos del ectodominio, principalmente con la  $\text{His}^{62}$  y el  $\text{Asp}^{197}$  (Liu y cols., 2008). Este grupo también ha descrito que los residuos  $\text{His}^{201}$  e  $\text{His}^{267}$  están implicados en el efecto de ambos iones. Sin embargo, existen algunas discrepancias con los resultados obtenidos por Acuña-Castillo y cols. (2007), según los cuales, estos dos últimos residuos  $\text{His}$  participan en la inhibición ejercida por  $\text{Cu}^{2+}$  pero no por  $\text{Zn}^{2+}$ . Además, Acuña-Castillo y cols. describen que la  $\text{His}^{62}$  sólo está implicada en la regulación de la respuesta a 3'-O-(4-benzoil)benzoil ATP (BzATP).



**Figura 5.- Residuos implicados en la regulación de la actividad de los receptores P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>4</sub> y P2X<sub>7</sub> por los iones  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ .** Los residuos marcados en gris participan en la modulación por  $\text{Zn}^{2+}$ , mientras que los residuos que aparecen en negro son los responsables del efecto del  $\text{Cu}^{2+}$ . En blanco se han introducido los residuos del receptor P2X<sub>7</sub> implicados en el efecto de los iones según el artículo de Liu y cols. (2008). La figura se ha obtenido de la revisión publicada por Huidobro-Toro y cols. (2007) en Eur Biophys J.

En todos los subtipos de subunidades P2X aparece un motivo altamente conservado, con la secuencia YxxxK próxima al segmento TM2, que participa en el transporte del receptor a la membrana y en el mantenimiento de su expresión en la misma (Chaumont y cols., 2004). En el extremo C-terminal también aparecen numerosos dominios implicados en la

internalización del receptor, en el caso de los receptores P2X<sub>1</sub> y P2X<sub>4</sub>, ésta se ve incrementada cuando se lleva a cabo la estimulación con ATP (Ennion y Evans, 2001; Bobanovic y cols., 2002). En el caso del receptor P2X<sub>4</sub> la internalización parece estar dirigida por una secuencia endocítica no-canónica YxxGφ localizada en el extremo C-terminal a continuación de la secuencia canónica Yxxφ que no sería accesible a la molécula adaptadora de clatrina debido a la estructura trimérica del canal (Royle y cols., 2005). En esta región intracelular también se encuentran diferentes residuos que regulan la actividad del canal, como es el caso de las Tyr<sup>362</sup>, Tyr<sup>363</sup> y Tyr<sup>370</sup> del receptor P2X<sub>1</sub> (Toth-Zsamboki y cols., 2002) o de la Tyr<sup>343</sup> del receptor P2X<sub>7</sub>, situada al final del segmento TM2 (Kim y cols., 2001a). La topología de membrana propuesta para los receptores P2X les permitiría interactuar a través de su extremo C-terminal con proteínas intracelulares. Por ejemplo, en el dominio C-terminal de la subunidad P2X<sub>7</sub> se ha descrito la presencia de una secuencia de unión a lípidos similar a la secuencia de unión a lipopolisacárido (LPS) descrita en otras proteínas. En esta región se encuentran dos residuos, Arg<sup>578</sup> y Lys<sup>579</sup>, cuya mutación afecta al transporte, a la estabilización en la membrana y a la funcionalidad del receptor (Denlinger y cols., 2001). En el dominio intracelular del receptor P2X<sub>7</sub> también se han identificado secuencias específicas mediante las cuales podría estar asociado a un complejo de 11 proteínas muchas de las cuales forman parte del citoesqueleto y participan en su organización, otras sin embargo están implicadas en procesos de señalización o participan en la regulación del propio canal (Kim y cols., 2001a). (Figura 6).

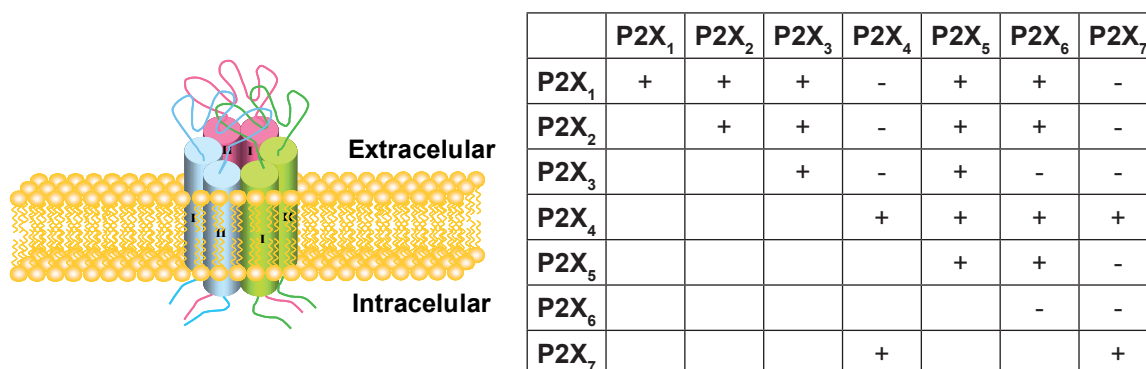


**Figura 6.- Representación esquemática de las proteínas identificadas con las que podría interactuar el receptor P2X<sub>7</sub>.**

Figura basada en la mostrada en The EMBO Journal por Kim y cols. (2001). RPTPβ: Receptor con actividad tirosina fosfatasa β. PI4K: Fosfadilinositol 4-quinasa. MAGuK: Guanilato ciclase asociada a membrana P55.

### 1.3.2.- Oligomerización

La estructura de los receptores P2X no se conoce con exactitud, mediante diferentes abordajes experimentales se han encontrado evidencias que sugieren que están formados por 3 o múltiplos de 3 subunidades (Nicke y cols., 1998; Stoop y cols., 1999; Ding y Sachs, 1999; Jiang y cols., 2003; Barrera y cols., 2007) (figura 7). En sistemas heterólogos se ha demostrado que la expresión de un único tipo de subunidad P2X conduce a la formación de homómeros funcionales, aunque en el caso de las subunidades P2X<sub>5</sub> y P2X<sub>6</sub> estas interacciones son más limitadas (Collo y cols., 1996; Garcia-Guzman y cols., 1996; Soto y cols., 1996; Barrera y cols., 2005). En el caso de este último subtipo, se ha propuesto que la formación de canales funcionales depende del grado de glicosilación (Jones y cols., 2004). Recientemente se ha descrito la existencia de una región, en su extremo N-terminal, formada por residuos no cargados que inhibe su ensamblaje y salida del retículo endoplásmico, quedando retenido en su forma monomérica (Ormond y cols., 2006).



**Figura 7.- Esquema de la estructura trimérica propuesta para los receptores funcionales P2X.** En la tabla se indican las combinaciones de subunidades que pueden interactuar entre sí para formar receptores heteroméricos. Los datos se han obtenidos del trabajo de Torres y cols. (1999) y se ha incluido la posibilidad de heteromerización entre las subunidades P2X<sub>4</sub> y P2X<sub>7</sub> recientemente propuesta por Guo y cols. (2007).

Estudios realizados por Torres y cols. (1999) demostraron que todas las subunidades P2X, a excepción de la P2X<sub>7</sub>, eran capaces de combinarse en mayor o menor grado con otras subunidades para formar heterómeros, siendo las subunidades P2X<sub>3</sub> y P2X<sub>4</sub> las más restrictivas (tabla mostrada en la figura 7). Sin embargo, estudios recientes sugieren que las subunidades P2X<sub>7</sub> y P2X<sub>4</sub> también podrían coensamblar o establecer algún tipo de interacción funcional (Guo y cols., 2007), lo que es bastante lógico dado que ambos subtipos se coexpresan en la mayoría de los tejidos.

Las propiedades farmacológicas de un receptor están determinadas por las características de las subunidades que lo forman. En muchos casos, una de las subunidades

del receptor heteromérico domina el fenotipo del canal resultante. Mientras que, en otras ocasiones las propiedades del canal resultante difiere de las presentadas por los receptores homoméricos de las subunidades que lo forman, es el caso del receptor  $P2X_{2/3}$  presente en neuronas sensoriales (Lewis y cols., 1995) o del receptor  $P2X_{2/6}$ , de cerebro medio, en el que las características farmacológicas del receptor  $P2X_2$  se modifican por la presencia de la subunidad  $P2X_6$  (King y cols., 2000). Otros heterómeros funcionales, además de los mencionados anteriormente, son los formados por las subunidades  $P2X_{4/6}$  (Le y cols., 1998),  $P2X_{1/5}$  (Torres y cols., 1998a; Haines y cols., 1999; Le y cols., 1999),  $P2X_{2/5}$  (Patel y cols., 2001) y  $P2X_{1/2}$  (Brown y cols., 2002).

Habitualmente, en un mismo tejido o tipo celular se coexpresen diversas subunidades sin que se conozca con exactitud la composición de los receptores  $P2X$  endógenos. Además, en muchos casos a lo largo del desarrollo se producen cambios en la expresión de las diferentes subunidades en distintos órganos y sistemas, como el sistema nervioso, el tracto intestinal, la clóquea, el hígado o las células del sistema inmune (Xiang y Burnstock, 2005; Giaroni y cols., 2006; Huang y cols., 2006; Xiang y cols., 2006; Heine y cols., 2007).

### **1.3.3.- Características funcionales.**

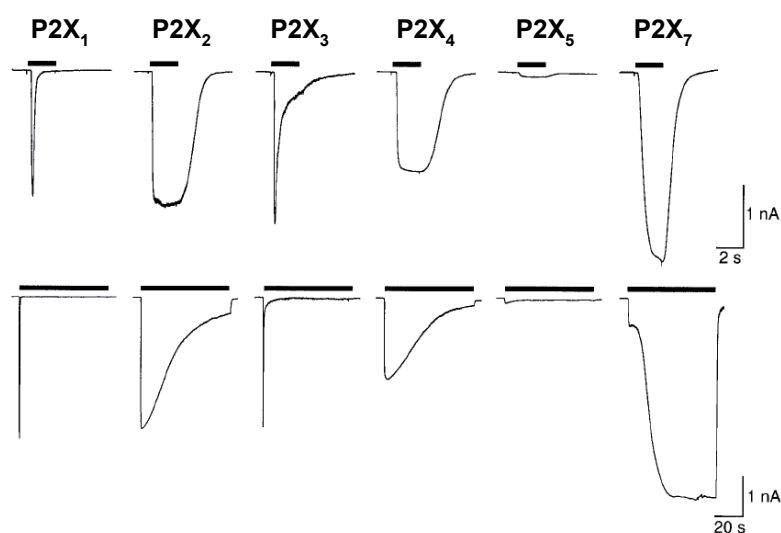
Los diferentes receptores  $P2X$  pueden distinguirse en base a su afinidad por el ligando fisiológico, a la variación de su respuesta con el tiempo (desensibilización), al perfil farmacológico y a la sensibilidad a determinados iones, como son  $H^+$ ,  $Cu^{2+}$  o  $Zn^{2+}$ , presentes en el medio extracelular (tabla 2).

La estimulación del receptor produce la entrada rápida, en milisegundos, y no selectiva de cationes  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$  y  $K^+$ , aunque el receptor  $P2X_5$  también es significativamente permeable a  $Cl^-$  (Bo y cols., 2003), causando la despolarización de la membrana. La permeabilidad relativa a  $Ca^{2+}$  ( $P_{Ca}/P_X$ ;  $X=Na^+$ ,  $Cs^+$  o  $K^+$ ) de los receptores  $P2X$  es igual o superior a la de otros iones presentes en el medio extracelular, variando desde valores ligeramente superiores a 1 hasta próximos a 5. El flujo de  $Ca^{2+}$  a través de los receptores  $P2X$  es mayor que el de los receptores nicotínicos y similar al descrito para los receptores de NMDA (Egan y Khakh, 2004).

Se cree que los dos segmentos transmembrana de las diferentes subunidades que forman el receptor son los responsables de la formación del canal. Además, estas regiones desempeñan un papel activo en el transporte de iones, por ejemplo, ambas participan en la reorganización estructural que tiene lugar al abrirse el canal (Haines y cols., 2001; Li y cols., 2004; Silberberg y cols., 2005). Por otro lado, TM2, y posiblemente también TM1, interaccionan con los iones y regulan propiedades del canal como la conductancia, permeabilidad y el paso de  $Ca^{2+}$  (Nakazawa y cols., 1998; Khakh y Egan, 2005; Samways y Egan, 2007).

La variación de la respuesta con el tiempo difiere entre los distintos receptores (figura 8, tabla2), en algunos casos la respuesta decae rápidamente durante la aplicación continuada

del agonista (desensibilización), como ocurre con los receptores P2X<sub>1</sub> y P2X<sub>3</sub> donde disminuye en más de un 90% en 1-2 segundos de aplicación del agonista. Las respuestas del resto de receptores homoméricos y del receptor heteromérico P2X<sub>2/3</sub> son más sostenidas, y en el caso del receptor P2X<sub>7</sub> la corriente se mantiene durante varios minutos. Estudios realizados con quimeras pusieron de manifiesto que ambos dominios transmembrana contribuyen a la desensibilización (Werner y cols., 1996). Posteriormente se ha demostrado que la mutación, en el receptor P2X<sub>2</sub>, de un sitio de fosforilación por PKC conservado en el extremo N-terminal de todas las subunidades P2X induce una disminución de la amplitud de respuesta, así como un aumento en la velocidad de desensibilización (Boue-Grabot y cols., 2000). En cuanto al dominio extracelular hay estudios que ponen de manifiesto que la región más próxima al extremo N-terminal regula la desensibilización, mientras que la mitad más cercana al dominio C-terminal participa en la estabilización de la conformación abierta del canal (Zemkova y cols., 2004).



**Figura 8.- Comparación de la desensibilización lenta o rápida de los receptores P2X de rata.** En estos experimentos, se utilizaron células HEK293 transfectadas con las diferentes subunidades. Se realizaron aplicaciones de 30  $\mu$ M ATP, excepto para el receptor P2X<sub>7</sub>, durante 30 s (panel superior) o 60 s (panel inferior). En el caso del receptor P2X<sub>7</sub>, el registro muestra la respuesta a 1mM ATP después de una estimulación previa de 2 minutos con el agonista. La figura se ha obtenido de la revisión escrita por North (2002) publicada en *Physiol Rev*.

Si se produce desensibilización, para que la recuperación de la respuesta tenga lugar es necesario el lavado del agonista durante varios minutos. La velocidad de recuperación depende de diversos factores tales como el agonista utilizado, la presencia de calcio en el medio extracelular, la concentración de agonista libre o de procesos de regulación intracelular (Sokolova y cols., 2004; Cook y cols., 1998; Rettinger y Schmalzing, 2004).



El tamaño del canal es de 8-20 Å, lo que permite el paso de pequeños iones, pero no de grandes cationes orgánicos como N-metil-D-glucamina (NMDG<sup>+</sup>). No obstante, algunos receptores P2X, los subtipos P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>5</sub> y P2X<sub>7</sub>, pueden aumentar el diámetro del poro en respuesta a una aplicación sostenida de ATP, de modo que permiten el paso de grandes cationes (Egan y cols., 2006).

En algunos tipos celulares, por ejemplo en macrófagos, la activación del receptor P2X<sub>7</sub> conduce a la formación en pocos segundos de un poro citolítico que permite la entrada de moléculas con un tamaño molecular superior a los 900 Da como puede ser la sonda Yo-Pro-1. Hasta hace poco se pensaba que esta entrada tenía lugar mediante la dilatación del canal. Sin embargo, recientemente varios estudios han puesto de manifiesto que la formación del poro se produce a través de la activación de un mecanismo independiente (Faria y cols., 2005; Jiang y cols., 2005). La activación del receptor P2X<sub>7</sub> induce el reclutamiento de moléculas accesorias, entre las que se encuentra la panexina 1 (Pelegri y Surprenant, 2006; Pelegri y Surprenant, 2007; Panchin, 2005).

Existen numerosos estudios acerca del papel que desempeña el largo extremo C-terminal del receptor P2X<sub>7</sub> en la función del canal y en la formación del poro, por ejemplo, está demostrado que la eliminación de los últimos 177 aminoácidos bloquean la formación del segundo sin afectar al primero (Collo y cols., 1996; Klapperstuck y cols., 2001). También se ha descrito que diferentes formas truncadas del receptor muestran alteraciones en las cinéticas de respuesta a ATP, debido a cambios en el sitio de unión del ligando o en la expresión en la membrana (Klapperstuck y cols., 2001; Worthington y cols., 2002). Respecto a este último hecho, Smart y cols. (2003) han demostrado la implicación de la región comprendida entre los residuos 551-581 en la regulación de la expresión del receptor en la membrana.

#### 1.3.3.1.- Farmacología.

En el caso de los receptores purinérgicos no se dispone, en la mayoría de los casos, de una farmacología clara que permita discriminar entre los diferentes subtipos de receptores P2X, e incluso existen agonistas y antagonistas que a las mismas concentraciones pueden actuar tanto sobre receptores P2X como P2Y. Estas limitaciones farmacológicas dificultan el estudio de los diferentes receptores de nucleótidos en los tejidos nativos. En la tabla 2, se resumen las herramientas farmacológicas disponibles para la caracterización funcional de los receptores P2X de rata.

En general, pueden distinguirse dos tipos de receptores P2X. Por una parte, los receptores P2X<sub>1</sub> y P2X<sub>3</sub> con una elevada afinidad, baja EC<sub>50</sub>, por ATP y que son activados por el análogo  $\alpha,\beta$ -meATP. Por otro lado, los receptores P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>5</sub>, P2X<sub>6</sub> y P2X<sub>7</sub> con un valor de EC<sub>50</sub> para el ligando fisiológico mayor e insensibles al  $\alpha,\beta$ -meATP. Las curvas dosis respuesta para los receptores heterólogos muestran unos valores de EC<sub>50</sub> para el ATP que oscilan desde el rango nanomolar (EC<sub>50</sub>  $\approx$  100 nM, P2X<sub>1,3</sub>) hasta el micromolar (EC<sub>50</sub>  $\approx$  10  $\mu$ M, P2X<sub>2,4,6</sub>), siendo el receptor P2X<sub>7</sub> el que posee una afinidad más baja por el ligando fisiológico (EC<sub>50</sub> =

400  $\mu\text{M}$ ). Aunque hay que tener en cuenta que la afinidad de los receptores por el ATP varía entre las diferentes especies (Bianchi y cols., 1999; Young y cols., 2007), por ejemplo, el receptor  $\text{P2X}_7$  humano y de rata presentan una afinidad por el agonista fisiológico 10 veces superior que el receptor  $\text{P2X}_7$  murino, mientras que BzATP es 100 veces más potente sobre el receptor  $\text{rP2X}_7$  que sobre  $\text{mP2X}_7$ . Mediante estudios mutacionales se ha comprobado que los residuos  $\text{Asn}^{284}$  y  $\text{Lys}^{127}$  del receptor  $\text{rP2X}_7$  son los responsables de la mayor sensibilidad a BzATP. Sin embargo, en el caso del ATP parece que sólo está implicada la  $\text{Asn}^{284}$  (Young y cols., 2007). Estas diferencias entre ortólogos de un mismo receptor también se producen en la potencia de otros agonistas y antagonistas (Jiang y cols., 2000b).

Otros nucleósidos trifosfato (CTP, GTP) pueden actuar sobre diversos subtipos de receptores  $\text{P2X}$ , pero con menor potencia que el ATP, al igual que ocurre con las diadenosina polifosfatos ( $\text{Ap}_n\text{A}$ ,  $\text{Ap}_n\text{G}$ ;  $n=3-6$ ) que, además, no discriminan entre los diferentes receptores  $\text{P2X}$  ya que presentan una afinidad muy similar para todos ellos. Otros ligandos como el ADP, AMP o nucleótidos de uracilo son malos agonistas o inactivos.

Además de los NTPs y los dinucleótidos existen una serie de análogos sintéticos que pueden activar a estos receptores. Entre ellos se encuentran el 2MeSATP, que es un buen agonista de todos los receptores  $\text{P2X}$ , y también de algunos receptores  $\text{P2Y}$ , y el BzATP, que actúa sobre los subtipos  $\text{P2X}_1$ ,  $\text{P2X}_5$  y  $\text{P2X}_7$ .

La falta de selectividad entre los diferentes subtipos de receptores purinérgicos no es exclusiva de los agonistas, ya que los antagonistas más utilizados, suramina, PPADS o azul reactivo, tampoco permiten discriminar entre los diferentes receptores  $\text{P2X}$ , ni siquiera entre los dos subtipos de receptores  $\text{P2}$ . Una de las ventajas que tienen estos antagonistas clásicos es que son inactivos sobre los receptores recombinantes  $\text{P2X}_4$  y  $\text{P2X}_6$ . No obstante, en los últimos años se han logrado avances importantes en la identificación de antagonistas específicos para determinados subtipos de receptores  $\text{P2X}$  basándose en la estructura de la suramina y del PPADS (Lambrecht y cols., 2002). Entre los análogos de la suramina se encuentran NF449, que es 1000 veces más potente para el receptor  $\text{P2X}_1$  ( $\text{EC}_{50} \approx \text{nM}$ ) que para el receptor  $\text{P2X}_3$  (Braun y cols., 2001). El análogo del PPADS, MRS-2257, es 10-14 veces más potente sobre los receptores  $\text{P2X}_1$  y  $\text{P2X}_3$  que el propio PPADS (Jacobson y cols., 2002). Tanto NF449 como MRS-2257 son inactivos sobre el resto de receptores  $\text{P2X}$ . Otra ventaja de estos nuevos antagonistas es que presentan menos efectos inespecíficos que aquellos de los que derivan.

Los compuestos trinitrofenol derivados, como TNP-ATP, son 1000 veces más potentes sobre los receptores  $\text{P2X}_1$ ,  $\text{P2X}_3$  y  $\text{P2X}_{2/3}$  ( $\text{EC}_{50} \approx \text{nM}$ ) que para otros receptores  $\text{P2X}$  (Virginio y cols., 1998). El antagonista competitivo de naturaleza no nucleotídica, A-317491, es específico para el receptor  $\text{P2X}_3$  homomérico, siendo bastante específico también para el receptor heteromérico  $\text{P2X}_{2/3}$  (Jarvis y cols., 2002).  $\text{Ip}_5\text{I}$  es un antagonista muy potente del receptor  $\text{P2X}_1$  ( $\text{EC}_{50} \approx \text{nM}$ ) y en menor medida del receptor  $\text{P2X}_3$  ( $\text{EC}_{50} \approx \mu\text{M}$ ) (King y cols., 1999; Dunn y cols., 2000).



Como ya se ha comentado, uno de los receptores sobre los que puede actuar el BzATP, cuyas respuestas son el objeto de estudio de esta tesis doctoral, es el receptor homomérico P2X<sub>7</sub>, el cuál posee unas características farmacológicas que permiten diferenciarlo con relativa facilidad de otros subtipos de receptores P2X. En primer lugar, es el receptor que presenta una menor afinidad por el agonista fisiológico ATP, rango mM, al tiempo que su afinidad por el análogo estructural BzATP es muy elevada, el valor de EC<sub>50</sub> de este último es 10-30 veces menor que la descrita para el ATP (North, 2002). Los niveles extracelulares de ATP en condiciones fisiológicas son del rango pmolar o nanomolar, pero este compuesto puede ser liberado de diversos tipos celulares, incluso por neuronas, en respuesta a cambios osmóticos, estímulos eléctricos o mecánicos... (Lazarowski y cols., 2003). Es posible que estímulos fisiológicos no induzcan la liberación de ATP en concentraciones suficientes para activar el receptor P2X<sub>7</sub>. Sin embargo, estos niveles sí se pueden alcanzar en situaciones patológicas como inflamación y trauma (Le Feuvre y cols., 2002). Otra posibilidad es que el ATP no sea el único agonista del receptor P2X<sub>7</sub>, sino que estimulaciones con bajas concentraciones de otro compuesto permitiera la activación del receptor por otros ligandos como ocurre con el ADP y el AMP (Chakfe y cols., 2002). Seman y cols. (2003) han descrito que el NAD<sup>+</sup> extracelular puede inducir la apoptosis de células T mediante la activación de una ectoenzima que mono-ADP-ribosila al receptor P2X<sub>7</sub> aumentando su actividad. También se ha visto que el receptor P2X<sub>7</sub> puede ser activado por péptidos de manera independiente a la liberación de ATP (Elssner y cols., 2004). En el caso de roedores, las respuestas mediadas por el receptor P2X<sub>7</sub> son bloqueadas reversiblemente por 10-100 nM BBG, concentración a la que este compuesto no actúa sobre ningún otro subtipo de receptor P2X, e irreversiblemente por oATP (Surprenant y cols., 1996). En el caso del BBG se pueden utilizar concentraciones más elevadas, hasta 1-2 μM, en aquellos casos donde no esté presente el receptor P2X<sub>2</sub>. El receptor P2X<sub>7</sub>, en roedores, es insensible a concentraciones superiores a 300 μM del antagonista suramina (Chessell y cols., 1998) y sensible a PPADS y a la inhibición por cationes divalentes (Virginio y cols., 1997). El receptor P2X<sub>7</sub> humano requiere una concentración de BBG 10 veces superior a la de rata para su inhibición (Jiang y cols., 2000b) y es sensible a la inhibición por KN-62 (Humphreys y cols., 1998), PPADS y suramina (Chessell y cols., 1998).

#### 1.3.3.2- Mecanismos de transducción de señal.

Como ya se ha comentado anteriormente, los receptores P2X regulan el paso de cationes (Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>) a través de la membrana plasmática, provocando la despolarización de la membrana que a su vez conduciría a la activación de canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje. Este proceso no requiere ni la producción ni la difusión de segundos mensajeros. Por tanto, el tiempo necesario para que se produzca la respuesta es muy corto. Por esa razón, este mecanismo de transducción desempeña un papel muy importante en la transmisión rápida neuronal y en la contracción muscular. Pero, como consecuencia de la entrada de Ca<sup>2+</sup> a

través de los receptores P2X y de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de voltaje, se produce una acumulación de este ión en el citoplasma pudiendo activar numerosas vías de señalización, entre las que se encuentran las CaMKII (calcio/calmodulina quinasa) y PKCs. Es posible que los receptores P2X estén implicados en el mantenimiento de la liberación sostenida de neurotransmisores a través de una ruta dependiente de la calmodulina quinasa. En neuronas granulares de cerebelo se ha demostrado que los receptores P2X<sub>7</sub> y P2Y<sub>1</sub> inducen la activación de la CaMKII en diferentes localizaciones subcelulares, el primero de ellos sería el responsable de la activación de la enzima en las fibras de las neuronas y el segundo en el soma y en las neuritas (Leon y cols., 2006). En estas mismas células, el receptor P2X<sub>7</sub> induce la salida exocitótica de glutamato (Leon y cols., 2007).

Además, la estimulación de los receptores P2X también puede inducir la activación de las tres grandes familias de MAP quinasas, las proteínas ERKs, las JNKs y la p38 a través de diferentes mecanismos dependiendo del tipo o modelo celular. En células de feocromocitoma PC12 el receptor P2X<sub>2</sub> activa a ERK1/2, cascada que también es estimulada en plaquetas por el receptor P2X<sub>1</sub> y por el receptor P2X<sub>3</sub> en neuronas de ganglios de la espina dorsal (Oury y cols., 2002; Seino y cols., 2006). El receptor P2X<sub>7</sub>, cuya señalización en los últimos años ha sido ampliamente estudiada debido a su importancia en sistema inmune y posterior identificación en otros tejidos y tipos celulares, activa diferentes tipos de proteínas MAPKs. Induce la activación de SAPK/JNK en macrófagos humanos y de roedores, de ERK y JNK en células Jurkat, de p38 y ERK1/2 en macrófagos de ratón y en astrocitos corticales de rata donde provoca un aumento de la expresión de la proteína quimioatrayente de monocitos (Humphreys y cols., 2000; Budagian y cols., 2003; Panenka y cols., 2001). La activación de la cascada de ERK1/2 por este receptor también ha sido descrita en mastocitos de ratón, en células de astrocitoma cuando se expresa de forma heteróloga y en la glándula parótida, donde también activa, aunque de manera independiente a la proteína quinasa D (Bulanova y cols., 2005; Gendron y cols., 2003b; Bradford y Soltoff, 2002).

Otra importante proteína de señalización regulada positivamente por el receptor P2X<sub>7</sub> es la fosfolipasa D (PLD). Esta regulación ocurre en diferentes modelos celulares como macrófagos, células de las glándulas submaxilares o astrocitos (el-Moatassim y Dubyak, 1993; Pochet y cols., 2003; Sun y cols., 1999). Además, no hay que olvidar que este receptor a través de su extremo C-terminal puede interaccionar con un complejo de 11 proteínas (Kim y cols., 2001a) de diferente naturaleza, por lo que puede actuar como nexo de comunicación entre la matriz extracelular, el citoesqueleto y diferentes cascadas de señalización intracelular.

El receptor P2X<sub>7</sub> puede regular los niveles de transcripción de diferentes proteínas en el núcleo. En células implicadas en la respuesta inmune, como son los macrófagos y la microglía, este receptor induce un aumento de la expresión de iNOS (Aga y cols., 2004; Gendron y cols., 2003a). Es posible que este aumento de la formación de NO este mediado por NF- $\kappa$ B, ya que al analizar la secuencia del promotor de iNOS se ha detectado un posible

elemento de unión a dicho factor de transcripción, que puede ser activado por el receptor  $P2X_7$ . Otras moléculas proinflamatorias cuyos niveles de expresión también son regulados por el receptor  $P2X_7$  son IL-4, IL-6, IL-13 (Bulanova y cols., 2005).

#### 1.3.4.- Expresión tisular e importancia fisiológica.

Los receptores  $P2X$  presentan una amplia distribución y muchos tejidos expresan más de un subtipo de receptor. Se expresan principalmente en tejidos excitables como tejido nervioso y músculo liso, aunque también se han detectado en tejidos endocrinos, plaquetas y células del sistema inmune (Ralevic y Burnstock, 1998). En sistema nervioso estos receptores se expresan tanto en glía como en neuronas (North, 2002; Rubio y Soto, 2001;).

El receptor  $P2X_1$  se expresa abundantemente en el músculo liso vascular y en el corazón (Vial y Evans, 2002; Hansen y cols., 1999;). Además, este receptor se coexpresa con receptores  $P2Y$  en plaquetas, donde regulan la presión sanguínea y el mantenimiento de la homeostasis (Mahaut-Smith y cols., 2004). Asimismo, estudios realizados con ratones machos deficientes en el receptor  $P2X_1$  han puesto de manifiesto que estos animales son estériles, lo que indica que este receptor media la transmisión purinérgica en el vaso deferente (Mulryan y cols., 2000).

En el sistema nervioso se ha detectado la presencia del mRNA de las subunidades  $P2X_1$ , sin embargo el fenotipo no se corresponde con el de un receptor homomérico, estudios en neuronas del ganglio cervical superior apoyan la hipótesis de que realmente se trata de un receptor heteromérico  $P2X_{1/2}$  (Calvert y Evans, 2004).

El receptor  $P2X_2$  se expresa abundantemente en el sistema nervioso donde participa en la facilitación de la liberación presináptica de neurotransmisores en hipocampo, regula la respuesta a hipoxia en el cuerpo carotideo y regula los movimientos peristálticos del intestino (Khakh y cols., 2003; Ren y cols., 2003; Rong y cols., 2003).

El receptor  $P2X_3$  está implicado en la percepción del dolor, distensión de la vejiga urinaria y del intestino (Kennedy y cols., 2003; Dorn y cols., 2004; Bian y cols., 2003). Existen numerosas evidencias que indican que este receptor participa en el dolor crónico o persistente provocado por procesos inflamatorios o de daño nervioso y que desempeña un papel importante en la transmisión de información procedente de las vísceras. En ratones deficientes en  $P2X_3$  se ha observado una disminución del comportamiento asociado a alodinia mecánica, un tipo de modelo de daño neuropático que tiene lugar en pacientes de SIDA o diabéticos (Cockayne y cols., 2000; Souslova y cols., 2000). Estos ratones presentan defectos en la sensación aferente, por ejemplo no controlan cuando se produce el llenado de la vejiga. La presencia del receptor  $P2X_3$  también ha sido descrita en terminaciones sinápticas de cerebro medio y, junto con el receptor  $P2X_1$ , en neuronas granulares de cerebelo (Díaz-Hernández y cols., 2001; Hervas y cols., 2003).

El receptor heteromérico  $P2X_{2/3}$  está presente en la lengua, de manera que cuando las papilas gustativas liberan ATP, éste activaría al receptor presente en los nervios gustativos

(Finger y cols., 2005). También se ha descrito su participación en la respuesta a hipoxia de las células del cuerpo carotideo, en este caso parece ser que son las subunidades P2X<sub>2</sub> las que desempeñan un papel más importante (Gourine, 2005).

El receptor P2X<sub>4</sub> también está implicado en la percepción del dolor, aunque parece que en este caso es debido a su expresión en microglía más que en neuronas. Se piensa que la liberación de ATP que tiene lugar durante procesos de daño de un nervio o de isquemia activaría al receptor P2X<sub>4</sub> e induciría la liberación del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) por parte de la microglía (Coull y cols., 2005). Este factor actuaría sobre las neuronas adyacentes alterando la expresión de los transportadores de Cl<sup>-</sup> afectando a la transmisión GABAérgica inhibitoria.

Los receptores P2X<sub>2</sub> y P2X<sub>4</sub> se localizan en las sinapsis excitatorias, sobre todo en la periferia de la sinapsis donde existe una baja densidad de receptores de glutamato tipo AMPA, lo que puede indicar que los receptores P2X sólo se activan cuando se produce un aumento en el disparo del potencial de acción y se libera una gran cantidad de ATP (Rubio y Soto, 2001).

Se piensa que el receptor P2X<sub>4</sub> podría ser el responsable del incremento de la potencia de la contracción del músculo cardíaco observada en respuesta a ATP (Mei y Liang, 2001; Hu y cols., 2002).

Las subunidades P2X<sub>5</sub> y P2X<sub>6</sub> normalmente se encuentran formando parte de canales heteroméricos (North, 2002). El receptor P2X<sub>5</sub> se clonó inicialmente del ganglio celíaco de rata y de corazón (Collo y cols., 1996; Garcia-Guzman y cols., 1996). Tras el análisis del genoma humano, se ha detectado un polimorfismo en el gen que codifica para esta subunidad, presente en un 16% de individuos, que sí parece formar canales homoméricos (Bo y cols., 2003). El receptor P2X<sub>6</sub> es muy abundante en músculo esquelético y también ha sido detectado en el cerebro de rata (Urano y cols., 1997; Nawa y cols., 1998; Soto y cols., 1996).

El receptor P2X<sub>7</sub> fue identificado inicialmente como el receptor de macrófagos denominado P2Z (Buisman y cols., 1988; Di Virgilio, 1995). Interviene en la respuesta inmune, participa en la regulación de la expresión de citoquinas y de intermediarios inflamatorios como IL-1 $\beta$  o TNF- $\alpha$  (Brough y cols., 2003; Bulanov y cols., 2005). Su estimulación activa diferentes mecanismos de señalización que conducen a la formación de un poro que permite la entrada de moléculas de tamaño superior a 900 Da, a la reorganización del citoesqueleto, a la activación de caspasa 1 y a la muerte celular (Virginio y cols., 1999; Bulanov y cols., 2005). Aunque durante décadas, se consideró que este receptor era exclusivo de macrófagos y otras células del sistema inmune como microglía y células dendríticas (Surprenant y cols., 1996), en los últimos años se ha identificado en otros muchos tejidos, por ejemplo, en las glándulas salivares; en osteoblastos, fibroblastos e incluso en el sistema nervioso, donde podría estar implicado en procesos tan dispares como proliferación, liberación de neurotransmisores o activación de microglía y astrocitos (Baricordi y cols., 1999; Adinolfi y cols., 2002; Li

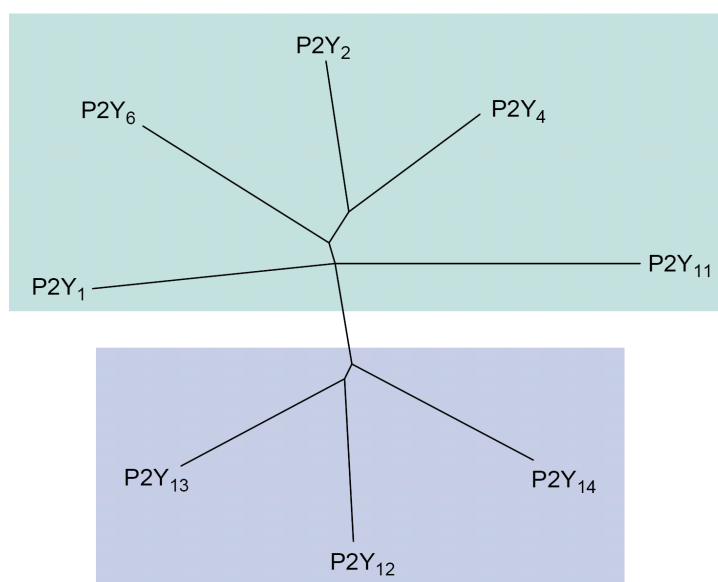
y cols., 2003; Gartland y cols., 2001; Solini y cols., 1999; Kukley y cols., 2001; Miras-Portugal y cols., 2003; Hervas y cols., 2003; Hervas y cols., 2005). El receptor P2X<sub>7</sub> se ha localizado alrededor de las placas de  $\beta$ -amiloide en modelos de ratón de la enfermedad de Alzheimer (Parvathenani y cols., 2003). Por ello, podría ser una posible diana farmacológica para el tratamiento de dicha patología, así como de otras alteraciones nerviosas como dolor neuropático o esclerosis múltiple (Sperlagh y cols., 2006).

#### **1.4.- Receptores metabotrópicos P2Y.**

Los receptores P2Y pertenecen a la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Hasta el momento, en mamíferos, se han clonado y caracterizado funcionalmente ocho subtipos, los receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> y P2Y<sub>14</sub>, de los cuales se conocen sus ortólogos en diferentes especies (Ralevic y Burnstock, 1998; Abbracchio y cols., 2003). Desde el punto de vista filogenético, los receptores P2Y están muy próximos a la familia de receptores de rodopsina, entre los que se encuentran los receptores de cisténil leucotrienos y de las hormonas glicoproteicas. Según su estructura, los receptores P2Y se pueden dividir en dos subtipos (figura 9). El primero de ellos estaría formado por los receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub> y P2Y<sub>11</sub>, mientras que segundo incluiría a los receptores P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> y P2Y<sub>14</sub>, el grado de homología de secuencia entre los miembros de esta familia es próximo al 50%. Además, recientemente se han descrito dos receptores de cisténil leucotrienos (CysLT1 y CysLT2) que son activados por UDP, indicando que algunos receptores GPCRs poseen una especificidad dual (Mellor y cols., 2001; Mellor y cols., 2003). Los saltos que se observan en la numeración de los receptores P2Y se deben a receptores que en principio fueron clasificados como tales, pero que, posteriormente, se descubrió que tenían otros ligandos principales, es el caso del receptor de leucotrieno LTB<sub>4</sub>, identificado inicialmente como el receptor P2Y<sub>7</sub> (Yokomizo y cols., 1997), del receptor de ácido lisofosfatídico 4 (receptor LPA4), identificado como P2Y<sub>9</sub> (Noguchi y cols., 2003), o del receptor de  $\alpha$ -cetoglutarato oxoglutarato 1 (OXGR1), que en un principio se denominó receptor P2Y<sub>15</sub> (Inbe y cols., 2004). En otras ocasiones, se trata de receptores clonados en vertebrados no mamíferos cuyos ortólogos en mamífero todavía no han sido identificados, por ejemplo, los receptores p2y3 y p2y8, obtenidos de cerebro de pollo y de *Xenopus laevis*, respectivamente (Webb y cols., 1996a; Bogdanov y cols., 1997). En otras ocasiones, éste sí que se ha identificado, es el caso de los receptores xp2y de *Xenopus* y tp2y de pavo que son ortólogos del receptor P2Y<sub>4</sub> (Bogdanov y cols., 1997; Boyer y cols., 1997).

En el genoma humano aparecen numerosas secuencias que codifican numerosos GPCRs huérfanos similares a los receptores P2Y conocidos. En diversos tejidos, se han detectado respuestas a nucleótidos que podrían estar mediados por algún receptor de nucleótidos que todavía no ha sido clonado, como el receptor ionotrópico de diadenosina polifosfatos presente en terminaciones sinápticas y el receptor metabotrópico de Ap<sub>5</sub>A de astrocitos de cerebelo (Pintor y Miras-Portugal, 1995; Jimenez y cols., 2002).

Muchas de las secuencias que codifican a estos receptores se encuentran agrupadas en el mismo cromosoma. Por ejemplo, en el cromosoma 3 humano, que se corresponde con los cromosomas 3 y 2 de ratón y rata respectivamente, se localizan las secuencias de los receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> y P2Y<sub>14</sub> junto con los genes de varios receptores huérfanos, como los genes GPR171 y GPR87, y otros ya identificados como el receptor de succinato 1. Los receptores P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>6</sub> se localizan juntos en el cromosoma 11. Los genes de los receptores P2Y no poseen intrones y no existen variantes de procesamiento alternativo, aunque sí se han detectado polimorfismos de diversos receptores P2Y, entre ellos del receptor P2Y<sub>2</sub> (Janssens y cols., 1999) y del receptor P2Y<sub>12</sub> (Cattaneo y cols., 2003). En el caso del receptor P2Y<sub>11</sub>, se ha identificado una proteína de fusión que es el resultado de un procesamiento alternativo intergénico entre los genes del receptor P2Y<sub>11</sub> y del gen SSF1 (Communi y cols., 2001a), ambos localizados en el cromosoma 19.



**Figura 9.- Árbol filogenético de la familia de los receptores P2Y.** Figura obtenida de la revisión publicada por Abbracchio y cols (2003) en Trends in Pharmacological Sciences.

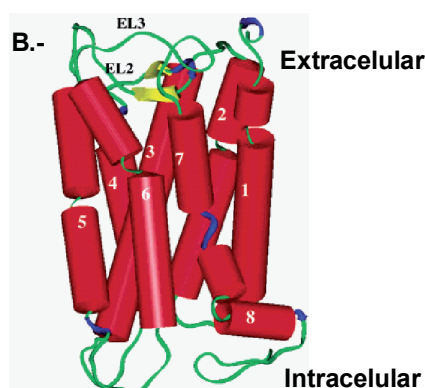
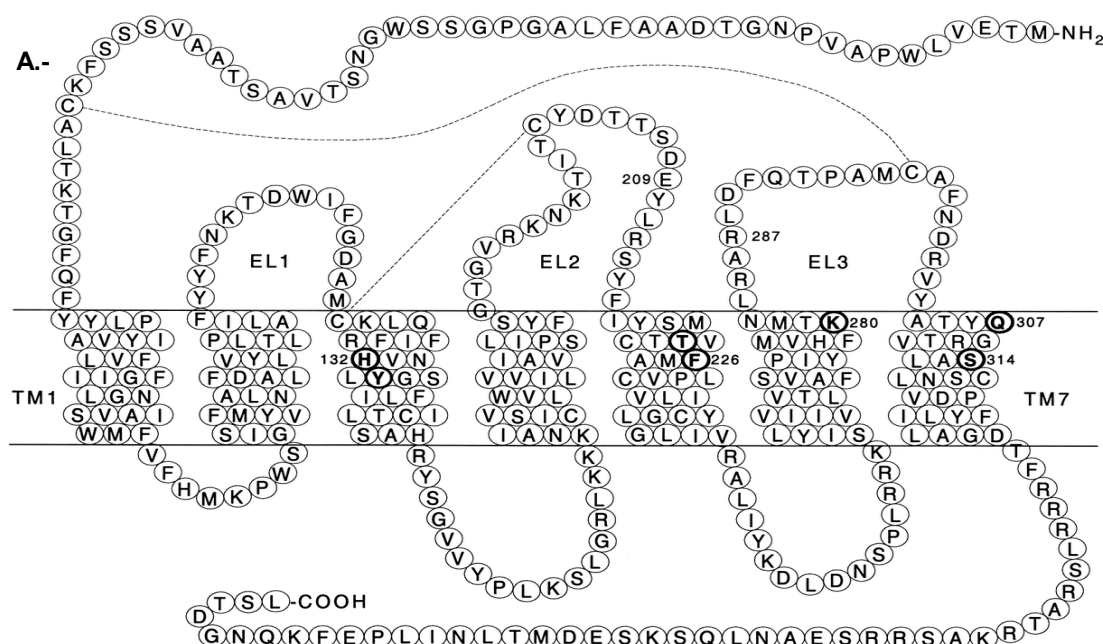
#### 1.4.1.-Estructura y topología transmembrana de los receptores P2Y.

El tamaño de estos receptores oscila entre los 328 aminoácidos del receptor P2Y<sub>6</sub> hasta los 377 aminoácidos del receptor P2Y<sub>4</sub>, con una masa molecular de 41-53 KDa. La homología de secuencia entre los diferentes subtipos de receptores P2Y está comprendida entre el 21-57%, aunque si se tienen en cuenta las sustituciones conservativas la similitud asciende al 36-69%. El grado de homología entre ortólogos de un mismo subtipo es del 80%.

Los receptores P2Y presentan características típicas de los receptores GPCRs, al



igual que éstos poseen siete regiones transmembrana hidrofóbicas, unidas por tres bucles extracelulares y tres bucles intracelulares (figura 10). El extremo N-terminal, orientado al exterior celular, posee una longitud de 21-51 aminoácidos, mientras que el dominio C-terminal, localizado en el citosol, está formado por 16-217 aminoácidos. En el extremo N-terminal existen secuencias de N-glicosilación. Esta modificación post-traducciona es esencial en la transducción de señal, pero no para la unión del ligando o la expresión en la membrana (Zhong y cols., 2004). Además, en las regiones extracelulares poseen cuatro residuos de cisteína que forman dos puentes disulfuros, uno de ellos entre la región N-terminal y el tercer bucle extracelular y el otro entre el primer y segundo bucle extracelular (Hoffmann y cols., 1999; Ding y cols., 2003). En el extremo C-terminal aparecen diversos sitios de fosforilación por PKCs.



**Figura 10.- A.- Estructura secundaria propuesta para el receptor P2Y<sub>1</sub>.** En los segmentos transmembrana, los círculos marcados en negrita indican los residuos que contribuyen a la unión del ligando. Las líneas discontinuas representan los puentes disulfuro. Los residuos Glu209 y Arg287 forman los sitios de meta-unión de baja afinidad. TM, segmento transmembrana. EL, bucle extracelular. **B.- Topología del receptor hP2Y<sub>1</sub>.** En rojo se indican las regiones con estructura en α-hélice, en amarillo las zonas con estructura en lámina β, en verde los giros y en azul las regiones con estructura al azar. Las figuras han sido obtenidas de los artículos publicados por von Kügelgen y Wetter (2000) y por Major y Fischer (2004).

Análisis mutacionales combinados con estudios de modelos moleculares han ayudado a identificar los posibles sitios de unión al ligando. Un modelo basado en el receptor de rodopsina propone la participación, en dicha interacción, de los residuos próximos al espacio extracelular de las regiones transmembrana. Esta hipótesis ha sido confirmada mediante experimentos de mutagénesis dirigida, según los cuales los residuos polares de las regiones transmembrana 3, 5, 6 y 7 son esenciales en la unión con el ligando (Ivanov y cols., 2006). En el caso del receptor P2Y<sub>1</sub>, alguno de los residuos implicados en dicha interacción son His<sup>132</sup> y Tyr<sup>136</sup> de la región TM3, Thr<sup>222</sup> y Phe<sup>226</sup> de la región TM5, Gln<sup>307</sup> y Ser<sup>314</sup> de la región TM7 y Lys<sup>280</sup> de la región TM6 (Guo y cols., 2002). El último residuo se correspondería con la Arg<sup>265</sup> de los receptores P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>11</sub> (Erb y cols., 1995; Qi y cols., 2001) y con la Arg<sup>256</sup> del receptor P2Y<sub>12</sub> (Cattaneo y cols., 2003).

Los residuos de naturaleza básica de las regiones TM6 y TM7 parecen estar involucradas en la interacción con los grupos fosfato cargados negativamente de los nucleótidos. La sustitución de dichos residuos afecta, no sólo a la afinidad por el agonista, sino también a la capacidad del receptor para adoptar la conformación del estado activo. Todos los receptores P2Y clonados poseen en la región TM6 un motivo H-X-X-R/K esencial para la activación por el ligando. En el caso de los receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub> y P2Y<sub>11</sub>, en la región TM7 existe también un motivo muy conservado e importante en la unión del agonista con la secuencia Y-Q/K-X-X-R, que en caso del segundo subgrupo estructural, los receptores P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> P2Y<sub>14</sub>, es sustituido por el motivo K-E-X-X-L, lo que sugiere que el reconocimiento del agonista puede ser diferente para ambos subtipos.

Estudios realizados con el receptor P2Y<sub>4</sub> sugieren que residuos del extremo N-terminal y del segundo bucle extracelular, en concreto los residuos Asn<sup>177</sup>, Ile<sup>183</sup>, Leu<sup>190</sup>, están involucrados en la activación del receptor (Herold y cols., 2004).

#### **1.4.2.- Posible dimerización.**

Durante mucho tiempo se ha pensado que los receptores acoplados a proteínas G actuaban como monómeros. Sin embargo, en los últimos años han surgido numerosas evidencias que indican que pueden formar estructuras homo- o heterodiméricas (Bouvier, 2001; Devi, 2001; Javitch, 2004). La heteromerización modifica las propiedades farmacológicas, la señalización y la internalización de los receptores acoplados a proteínas G (Rocheville y cols., 2000). Dependiendo del tipo de receptor la unión del ligando puede promover, inhibir o no afectar la formación de dímeros.

Aunque todavía se conoce muy poco sobre la estructura cuaternaria de los receptores P2Y, diferentes estudios han demostrado que el receptor P2Y<sub>1</sub> forma heterodímeros con el receptor A<sub>1</sub> de adenosina, interacción que es promovida por la unión del agonista, generándose un receptor dimérico que al igual que el receptor de adenosina A<sub>1</sub> inhibe a la adenilato ciclase a través de una proteína G<sub>i/o</sub>, pero con unas características farmacológicas intermedias, ya que es activado por ATP, no es inhibido por antagonistas de los receptores P2, pero si es



sensible a los del receptor de adenosina  $A_1$  (Yoshioka y cols., 2001; Yoshioka y cols., 2002a; Yoshioka y cols., 2002b). Estas interacciones también pueden producirse entre receptores P2Y, de igual o de diferente subtipo, por ejemplo, D'Ambrosi y cols. han descrito que en células PC12 los receptores P2Y<sub>4</sub> y P2Y<sub>6</sub> pueden formar estructuras homo- y/o heteroméricas en las que la unidad básica es el dímero, en el caso del receptor P2Y<sub>4</sub>, o el monómero si se trata del receptor P2Y<sub>6</sub>. Ambos homómeros se diferencian en que mientras el primero no se ve afectado por la estimulación con el agonista, éste sí estabiliza las interacciones entre diferentes moléculas del receptor P2Y<sub>6</sub> (D'Ambrosi y cols., 2006; D'Ambrosi y cols., 2007). El receptor P2Y<sub>2</sub> también puede formar homodímeros, independientemente de la presencia o ausencia del agonista (Kotevic y cols., 2005), al igual que el receptor P2Y<sub>12</sub>, aunque en este caso la formación de dímeros se ve impedida por el metabolito activo del fármaco clopidogrel que, como se explicará más adelante, es un antagonista de este receptor (Savi y cols., 2006).

#### 1.4.3.- Características funcionales de los receptores P2Y.

La estimulación de los receptores P2Y conduce a la activación de proteínas G heterotriméricas que se disocian en subunidades  $G_\alpha$  y el dímero  $G_{\beta\gamma}$ . Los diferentes subtipos de estos receptores pueden interaccionar con uno o más miembros de la familia de las proteínas G heterotriméricas (tabla 3).

En muchos casos, la activación por el agonista induce la desensibilización de los receptores acoplados a proteínas G, que conduce a una disminución de la respuesta y su internalización. Este proceso generalmente está mediado por la fosforilación de un dominio intracelular por proteínas quinasas de GPCR (GRK1-7), que en algunos casos conduce a la interacción con  $\beta$ -arrestinas y a la internalización mediada por clatrina. Uno de los receptores P2Y que sí se desensibiliza en presencia del agonista es el receptor P2Y<sub>2</sub> (Velazquez y cols., 2000; Santiago-Perez y cols., 2001). En este proceso es esencial su extremo C-terminal. La mutación de sitios de fosforilación por PKCs y GRKs en dicha región y en el tercer bucle intracelular disminuye la internalización y desensibilización del receptor. En este caso, están implicadas proteínas quinasas insensibles a esteres de forbol (Garra y cols., 1998; Flores y cols., 2005). Diversos estudios demuestran que el receptor P2Y<sub>1</sub> se desensibiliza tras la estimulación con el agonista, a través de un proceso endocítico dependiente de la fosforilación del receptor por PKCs y de la formación de vesículas recubiertas de clatrina (Hardy y cols., 2005; Baurand y cols., 2005). Por el contrario, existen divergencias sobre que sucede con el receptor P2Y<sub>12</sub>. Hardy y cols. (2005) han propuesto un mecanismo de desensibilización

Receptor	Agonistas (rata)	Antagonistas (humano)	Proteína G	Cascadas de señalización	Distribución
P2Y <sub>1</sub>	2MeSATP = 2MeSADP > ADP (nM)	MRS-2500 > MRS-2279 > MRS-2179 > RB2 > Suramina > PPADS	G <sub>q/11</sub>	PLC (+)	Plaquetas, corazón, músculo esquelético, tejidos neuronales, tracto digestivo.
P2Y <sub>2</sub>	UTP = ATP > CTP > GTP (μM)	Suramina	G <sub>q/11</sub> , G <sub>o</sub> , G <sub>12</sub>	PLC (+), Rac (+), RhoA (+)	Pulmón, corazón, músculo esquelético, bazo, riñón.
P2Y <sub>4</sub>	UTP = ATP = ITP = Ap <sub>4</sub> A (μM)	PPADS	G <sub>q/11</sub> , G <sub>o</sub>	PLC (+)	Placenta, pulmón, músculo liso vascular, cerebro, hígado.
P2Y <sub>6</sub>	UDP > UTP > ADP > 2MeSATP (μM)	RB2	G <sub>q/11</sub>	PLC (+)	Pulmón, corazón, aorta, bazo, placenta, timo, intestino, cerebro.
hP2Y <sub>11</sub>	AR-C67085 ≥ ATPγS = BzATP > ATP (UTP) > 2MeSATP (μM)	Suramina	G <sub>q/11</sub> , G <sub>s</sub> , G <sub>o</sub>	PLC (+), AC (+)	Bazo, intestino, células del sistema inmune.
P2Y <sub>12</sub>	2MeSADP > ADP > ATP (nM)	AR-C69931MX > Suramina > Clopidogrel	G <sub>i</sub> , G <sub>12/13</sub> ?	AC (-), RhoA (+)	Plaquetas, Sistema Nervioso
P2Y <sub>13</sub>	2MeSADP ≥ ADP >> ATP (nM)	MRS-2211	G <sub>lo</sub>	AC (-), PLC(+)	Bazo, leucocitos, medula ósea, hígado, cerebro.
P2Y <sub>14</sub>	UDP-glucosa (nM)		G <sub>lo</sub>	PLC(+)	Placenta, tejido adiposo, intestino, cerebro, bazo.

**Tabla 3.- Clasificación de los receptores purinérgicos P2Y.** Los datos han sido obtenidos de la revisión realizada por King y Townsend-Nicholson (2003), facilitada por Tocris en su página web, y de la revisión publicada por Communi y cols (2000) en Cellular Signalling. PLC, fosfolipasa C. AC, adenilato ciclasa.

en el que están implicadas las quinasas GRK2 y GRK6. Sin embargo, Baurand y cols. han observado que solo una fracción del receptor se internaliza transitoriamente, lo que unido a un reciclaje muy rápido a la membrana permite que permanezca funcional (Baurand y cols., 2000; Baurand y cols., 2005).

#### 1.4.3.1.- Farmacología.

Farmacológicamente los receptores P2Y se pueden clasificar en receptores activados por nucleótidos de adenina, que responden principalmente a ATP y ADP (receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub> y P2Y<sub>13</sub> de roedores y humano y el receptor P2Y<sub>11</sub> humano), receptores activados por nucleótidos de uracilo, que responden principalmente a UTP y UDP (receptores P2Y<sub>4</sub> y P2Y<sub>6</sub>) y receptores de especificidad mixta (receptores P2Y<sub>2</sub> humano y de roedores y P2Y<sub>4</sub> de roedores). Los agonistas del receptor P2Y<sub>14</sub>, tanto humano como de roedores, son azúcares activados, como la UDP-glucosa, UDP-galactosa, ácido UDP-glucurónico o UDP-N-acetilglucosamina (Chambers y cols., 2000; Freeman y cols., 2001). Sin embargo, el receptor P2Y<sub>14</sub> no es activado por ningún otro nucleótido, nucleósido o dinucleótido.

Algunos receptores P2Y pueden ser activados por diadenosina polifosfatos, aunque estos compuestos son menos potentes que los NTPs o NDPs (Hoyle y cols., 2001; Patel y cols., 2001).

La identificación y caracterización de los receptores P2Y también se complica debido a que la preparación de un determinado nucleótido puede estar contaminada por trazas de otros nucleótidos, a la presencia de ectonucleotidasas y a la interconversión entre nucleótidos de adenina y uracilo. Por ello, es necesario realizar incubaciones cortas o utilizar, siempre que sea posible, sistemas de perfusión. En ocasiones, se ha recurrido a la purificación de los nucleótidos mediante HPLC o a la adición de hexoquinasa para eliminar el ATP del medio extracelular.

En la tabla 3, se resumen las principales características farmacológicas de los ocho subtipos de receptores P2Y.

#### *Receptores específicos de nucleótidos de adenina.*

El único receptor P2Y que sólo es activado por ATP es el receptor P2Y<sub>11</sub>, el cual ha sido identificado únicamente en humano sin que se conozcan ortólogos en otras especies. El resto de receptores pertenecientes a este grupo, los receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub>, son activados preferencialmente por ADP, mientras que el ATP ejerce un efecto variable. Así, el receptor P2Y<sub>12</sub> es insensible a ATP, compuesto que actúa como agonista parcial muy débil del receptor P2Y<sub>13</sub>, al igual que su análogo 2MeSATP (Marteau y cols., 2003).

Para el receptor P2Y<sub>1</sub>, el 2MeSADP es un agonista diez veces más potente que el ADP (Waldo y Harden, 2004), este orden de potencia también se observa en la activación del receptor P2Y<sub>12</sub>, aunque la diferencia de potencia es de 100 veces (Hollopeter y cols., 2001; Zhang y cols., 2001). En el caso del receptor P2Y<sub>13</sub>, en algunos sistemas se mantiene este

perfil, mientras que en otros modelos, ambos agonistas son equipotentes (Communi y cols., 2001b; Zhang y cols., 2002; Marteau y cols., 2003; Fumagalli y cols., 2004).

En los últimos años, se han producido importantes avances en el desarrollo de antagonistas específicos de algunos receptores P2Y. En el caso del receptor P2Y<sub>1</sub> los antagonistas más potentes son análogos estructurales del ADP, como los derivados MRS-2179 y MRS-2279 (King, 2002). Para el receptor P2Y<sub>12</sub> también se han sintetizado algunos antagonistas muy potentes con una estructura análoga a la del ATP, entre los que se encuentran los compuestos ARC-67085 y ARC-69931 de Astra-Zeneca. El fármaco antitrombótico clopidogrel, cuyo uso clínico fue aprobado en 1997, es metabolizado en el hígado formándose un metabolito que actúa como antagonista de este receptor. El clopidogrel y la ticlopidina, han sido ampliamente utilizados en la caracterización de las respuestas plaquetarias a ADP y en el papel que estas desempeñan en la trombosis (Gachet, 2005).

#### *Receptores de nucleótidos de uracilo.*

El receptor P2Y<sub>2</sub> es activado por ATP y UTP de manera equipotente. Sin embargo UDP y ADP son inactivos (Nicholas y cols., 1996). Esta misma especificidad se observa en el caso del receptor P2Y<sub>4</sub> de roedores, mientras que el receptor P2Y<sub>4</sub> humano es selectivo para UTP (Communi y cols., 1995; Nguyen y cols., 1995).

El receptor P2Y<sub>6</sub> es activado preferencialmente por UDP, con una potencia 100 veces superior a la del UTP (Nicholas y cols., 1996), mientras que los nucleótidos de adenina no tienen efecto sobre este receptor.

No existen antagonistas selectivos para los receptores de nucleótidos de pirimidina, sobre ellos actúan a concentraciones micromolares los antagonistas clásicos suramina y azul reactivo 2. El receptor P2Y<sub>2</sub> es insensible a PPADS, pero si es bloqueado por suramina (Mateo y cols., 1996; Charlton y cols., 1996a). El receptor P2Y<sub>4</sub> no es sensible a suramina y el PPADS posee una eficacia variable dependiendo del tipo celular (Communi y cols., 1996; Charlton y cols., 1996b).

#### 1.4.3.2.- Vías de señalización intracelular.

Los receptores P2Y están acoplados principalmente a las dos vías principales de transducción de señal metabotrópicas, la hidrólisis de los lípidos de inositol por la fosfolipasa C (PLC) y la activación o inhibición de la adenilato ciclasa (AC) (tabla 1).

#### *Activación de la fosfolipasa C por receptores P2Y.*

Los receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub> y P2Y<sub>11</sub> están acoplados a la activación de la fosfolipasa C. La sensibilidad a *toxina pertussis* es variable, lo que indica que están implicados diferentes subtipos de proteínas G. La formación de inositol trifosfato inducida por los receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>6</sub> y P2Y<sub>11</sub> no es inhibida por el tratamiento con dicha toxina. Sin embargo, los receptores P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>4</sub> sí son parcialmente sensibles (Burnstock, 2007).

El receptor P2Y<sub>13</sub> también puede inducir la activación de la fosfolipasa C, como demuestran diferentes trabajos con líneas celulares donde el receptor se ha expresado de manera heteróloga (Communi y cols., 2001b; Zhang y cols., 2002; Kim y cols., 2005).

#### *Activación de la adenilato ciclasa por los receptores P2Y.*

El único subtipo que está acoplado positivamente al sistema adenilato ciclasa es el receptor P2Y<sub>11</sub> a través de una proteína G<sub>s</sub>, como demuestran estudios de expresión heteróloga en células CHO y en la línea celular HL-60 (Communi y cols., 1997; Communi y cols., 1999). Como ya se ha comentado, este receptor también puede activar a la fosfolipasa C mediante una proteína G<sub>q</sub>, y al igual que otros receptores P2Y que inducen la movilización de calcio intracelular, puede estimular o inhibir la actividad de diferentes isoformas de la adenilato ciclasa sensibles a calcio (Sen y cols., 1996; Sunahara y cols., 1996; Defer y cols., 2000).

#### *Inhibición de la adenilato ciclasa por receptores P2Y.*

Los últimos subtipos de receptores P2Y clonados, los receptores P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> y P2Y<sub>14</sub>, están acoplados negativamente al sistema adenilato ciclasa (Hollopeter y cols., 2001; Zhang y cols., 2001; Communi y cols., 2001b; Abbracchio y cols., 2003). La inhibición de esta vía por un receptor de nucleótidos acoplado a una proteína G sensible a *toxina pertussis*, ya había sido descrita con anterioridad en numerosos tipos celulares, entre los que se encontraban las plaquetas (Cooper y Rodbell, 1979), hepatocitos (Okajima y cols., 1987), células C6 glioma (Boyer y cols., 1993), células de Schwan (Berti-Mattera y cols., 1996) y células B10 del endotelio microvascular (Webb y cols., 1996b). Durante mucho tiempo, se pensó que el receptor P2Y<sub>1</sub> era el responsable de la inhibición de la adenilato ciclasa, pero el perfil farmacológico observado era muy diferente al del receptor P2Y<sub>1</sub> (Boyer y cols., 1993; Boyer y cols., 1994). Mediante estudios de expresión heteróloga y con ratones que presentan una expresión deficiente de este receptor se confirmó que el receptor P2Y<sub>1</sub> media la producción de inositol trifosfato, pero no la inhibición de la formación de AMPc inducida por ADP. Posteriormente, se ha demostrado que esta respuesta está mediada por el receptor P2Y<sub>12</sub>, que se corresponde con el receptor P2T<sub>AC</sub> expresado en plaquetas y que está relacionado con el receptor de ADP presente en otros modelos como células C6 glioma o células B10.

#### *Otras rutas de señalización reguladas por receptores P2Y.*

A través de su acoplamiento a proteínas G los receptores P2Y, al igual que otros receptores metabotrópicos, modulan la actividad de otras cascadas de transducción de señal.

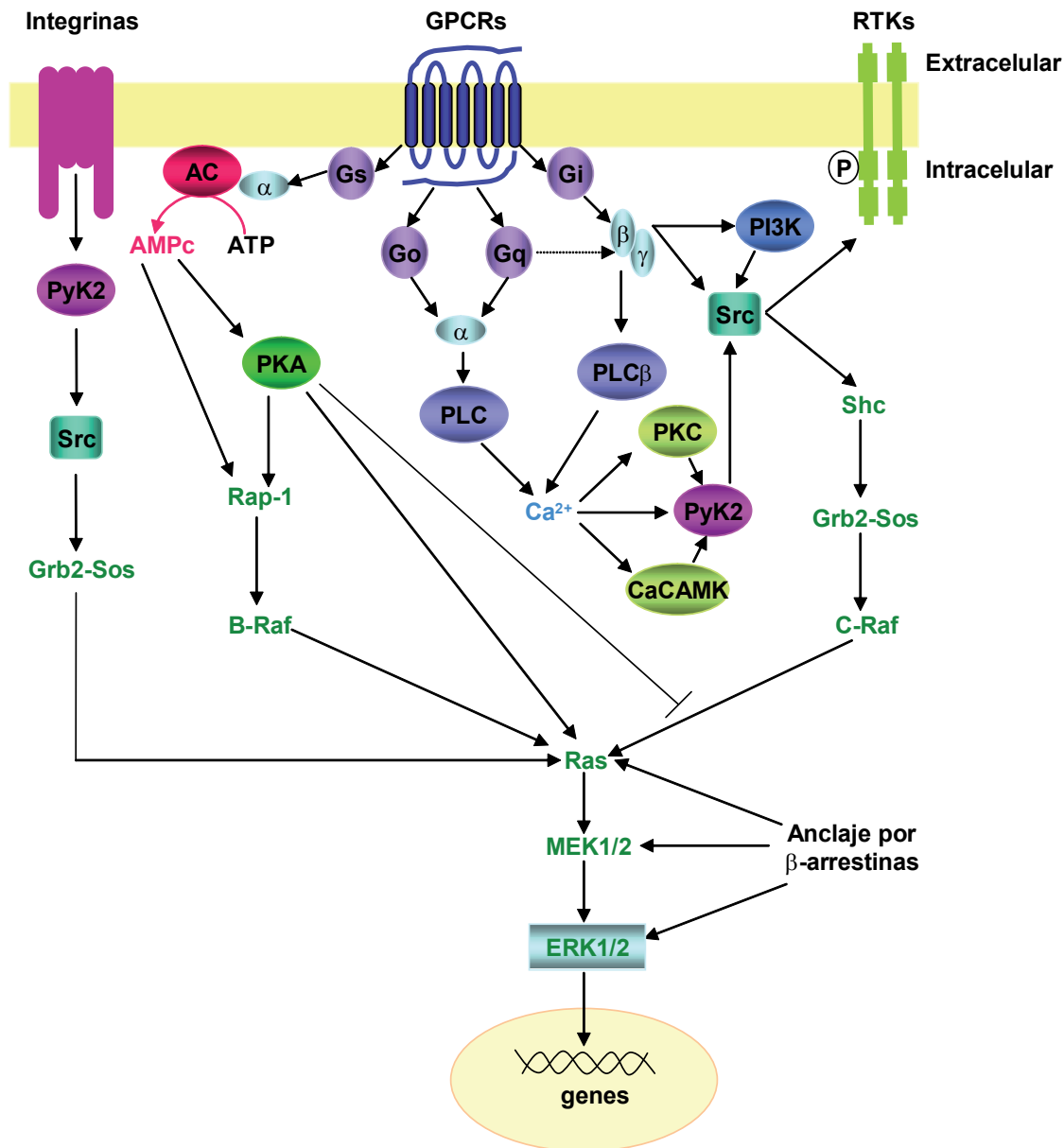
Diferentes subtipos de receptores P2Y pueden modular la actividad de canales iónicos a través de diferentes proteínas G. Los receptores P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>6</sub> están acoplados a

canales rectificadores de  $K^+$ , pero mientras que la modulación ejercida por el primero es parcialmente sensible a *toxina pertussis*, el efecto del receptor  $P2Y_6$  es insensible a dicho tratamiento (Mosbacher y cols., 1998). Asimismo, la inhibición de los canales de calcio tipo N ejercida por los receptores  $P2Y_1$ ,  $P2Y_2$ ,  $P2Y_4$  y  $P2Y_6$  está mediada por proteínas G sensibles e insensibles a *toxina pertussis*, mientras que la inhibición que ejercen sobre los canales de  $K^+$  tipo M es insensible a dicho tratamiento (Filippov y cols., 2003). El receptor  $P2Y_{12}$  activa canales de  $K^+$  tipo GIRK1/GIRK2 e inhibe canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje a través de las subunidades  $G\beta\gamma$  de proteínas  $G_{i/o}$  (Simon y cols., 2002).

Diversos autores han sugerido que los receptores  $P2Y$  pueden interaccionar y modular la función de diferentes proteínas independientemente de las proteínas G. De este modo, se ha comprobado que el receptor  $P2Y_1$  posee en su extremo C-terminal un dominio PDZ que puede interaccionar directamente con el factor regulador del intercambio  $Na^+/H^+$  (Hall y cols., 1998). Asimismo, en los receptores  $P2Y_{1,2,6,11}$  existe un motivo RRSE-QXK/RSE necesario para la regulación de los canales que median las corrientes de entrada en oocitos de *Xenopus* (Lee y cols., 2003b).

Los datos obtenidos por diferentes grupos sugieren que los receptores  $P2Y$  pueden estar acoplados a la activación de RhoA a través de una proteína  $G_q$  e independientemente de la PLC. De este modo, el cambio de forma de las plaquetas inducida por ADP a través del receptor  $P2Y_1$  parece estar mediada por la cascada RhoA-p160ROCK con la participación de alguna PKC (Paul y cols., 1999). Por otro lado, Sauzeau y cols., 2000 observaron que en células del músculo liso de aorta los receptores  $P2Y_1$ ,  $P2Y_2$ ,  $P2Y_4$  y  $P2Y_6$  activan a RhoA.

Los receptores  $P2Y$  inducen procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis en diferentes tejidos y tipos celulares. En muchos casos, en estos efectos están implicadas las rutas de las MAPKs, familia a la que pertenecen las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs), las proteínas quinasas activadas por estrés o quinasas del extremo C-terminal de c-jun (SAPK/JNK), ERK5/BMK1 y proteínas quinasas del grupo de p38. Normalmente, las proteínas ERKs median procesos de diferenciación/transformación y supervivencia, mientras que p38 y JNK están implicadas en apoptosis. ATP y UTP activan la ruta de p38 a través del receptor  $P2Y_2$  en células mesangiales del glomérulo de rata (Huwiler y cols., 2000). Dicha activación también tiene lugar en osteoblastos, donde además, el receptor  $P2Y_2$  también activa a ERK1/2. Por otro lado, el receptor  $P2Y_1$  activa la cascada de las ERKs y algunas isoformas de JNK, sin afectar a p38 (Sellers y cols., 2001). Los receptores  $P2Y_{12}$  y  $P2Y_{13}$  también están acoplados positivamente a ERK1/2 (Grobbs y cols., 2001; Communi y cols., 2001b). Esta cascada puede ser activada por vías muy heterogéneas, las más importantes aparecen esquematizadas en la figura 11 (van Biesen y cols., 1996b; Goldsmith y Dhanasekaran, 2007). Los receptores GPCRs pueden acoplarse a esta ruta de señalización a través de proteínas G,  $G_s$ ,  $G_q$ ,  $G_i$ ,  $G_o$ ,  $G_{12}$ , siendo los mecanismos más frecuentes aquellos en los que están implicados los subtipos  $G_q$  y  $G_i$ . A su vez la vía de las ERKs está implicada en la regulación de la expresión génica.



**Figura 11.- Esquema de las principales vías de activación de la cascada de las MAP quinasas.**

Como se ha visto, es posible que un mismo receptor pueda acoplarse a diferentes tipos de proteínas G y que module distintas vías de señalización. Esto puede deberse a que el receptor, al activarse, adopte más de un tipo de conformación que le permite asociarse con diferentes subunidades  $G_\alpha$  o ser consecuencia de la dimerización entre diferentes subtipos de receptores.

#### 1.4.4.- Expresión tisular e importancia fisiológica.

Como se muestra en la tabla 3, los receptores P2Y se expresan en multitud de tejidos



y tipos celulares, donde regulan numerosos procesos, algunos de los cuales se detallan a continuación.

#### *Receptores P2Y en el sistema vascular.*

En respuesta a estrés mecánico, las células del endotelio vascular liberan nucleótidos que, a través de receptores P2X y P2Y, regulan el tono vascular y la presión sanguínea (Kunapuli y Daniel, 1998). Estos compuestos inducen vasodilatación mediante la estimulación de receptores P2Y expresados en las células del endotelio vascular, que liberan prostaglandinas y óxido nítrico (Motte y cols., 1995). Las células endoteliales también expresan P2X, sobre todo P2X<sub>4</sub>, pero no se ha demostrado que induzcan vasodilatación (Yamamoto y cols., 2000). Por otro lado, los nucleótidos también provocan vasoconstricción mediante la estimulación de receptores P2, principalmente P2X<sub>1</sub>, en células de músculo liso vascular (SMC) (Ralevic y Burnstock, 1998), donde además pueden actuar como factores de crecimiento a través de los receptores P2Y (Hou y cols., 2002). La proliferación de SMC es esencial para el crecimiento y remodelación vascular inducida por fuerzas de deformación o de cizallamiento. Este tipo de estrés provoca la disminución de la expresión del receptor P2X<sub>1</sub>, produciéndose una disminución del tono vascular y un incremento del flujo sanguíneo, y un aumento de los niveles de los receptores P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>6</sub>, que se traduce en un aumento del crecimiento y migración celular, promoviendo, por tanto, el remodelamiento vascular (Wang y cols., 2003).

#### *Receptores P2Y y agregación plaquetaria.*

Las plaquetas constituyen uno de los modelos mejor conocidos y en los que más se ha estudiado la señalización de los receptores P2Y. El ADP induce el cambio de forma y la agregación plaquetaria debido a la exposición en la superficie celular de las integrinas GPIIb/IIIa y la unión de fibrinógeno (Hourani y Hall, 1994). En un principio, se pensaba que este nucleótido actuaba a través de un solo receptor, que por un lado inducía la inhibición de la adenilato ciclasa vía G<sub>i</sub> y por otro la activación de la PLC y movilización de calcio intracelular vía G<sub>q</sub>. Sin embargo, la combinación de técnicas de biología molecular y el empleo de antagonistas selectivos han permitido demostrar que la acción de ADP está mediada por dos receptores diferentes. El receptor P2Y<sub>1</sub> es el responsable del incremento de la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular, cambio de forma y agregación transitoria, como confirman estudios farmacológicos (Savi y cols., 1998) y con ratones deficientes en el receptor P2Y<sub>1</sub> (Fabre y cols., 1999). Mientras que el receptor P2T<sub>AC</sub>, que posteriormente fue identificado como el receptor P2Y<sub>12</sub>, está acoplado a la inhibición de la adenilato ciclasa, potencia la respuesta y estabiliza los agregados sin afectar a la movilización de calcio ni al cambio de forma. La inhibición de la adenilato ciclasa y la agregación plaquetaria son bloqueadas por ARC-67085 y los tratamientos con los fármacos antitrombóticos clopidogrel y ticlopidina, que tienen como diana al receptor P2Y<sub>12</sub>. Además, en pacientes con una mutación autosómica



recesiva en el gen de este receptor se ha observado una agregación plaquetaria deficiente (Hollopeter y cols., 2001).

Los receptores  $P2Y_1$  y  $P2Y_{12}$  no sólo se diferencian en sus cascadas de señalización, sino que también poseen distinta regulación. El primero de ellos se desensibiliza tras la estimulación con ADP debido a su internalización dependiente de clatrina, mientras que el receptor  $P2Y_{12}$  no se desensibiliza tras la exposición al agonista bien porque no es internalizado o bien porque existe un recambio muy rápido que permite su permanencia en la membrana (Baurand y cols., 2000; Baurand y cols., 2005).

#### *Receptores P2Y en los epitelios secretores.*

Otro de los sistemas en los que los receptores P2Y han sido ampliamente estudiados son los epitelios que tapizan las mucosas. Los nucleótidos activan receptores P2Y en células epiteliales de muchos órganos en condiciones fisiológicas y patológicas (von Kugelgen y Wetter, 2000).

En pulmón, la secreción de mucinas constituye un mecanismo de defensa innata ya que favorece la eliminación de partículas nocivas. La fibrosis cística es una enfermedad que se caracteriza por la secreción de mucinas escasamente hidratadas que obstruyen las vías respiratorias, facilitando la colonización por bacterias patógenas. Se debe a una alteración del transporte de  $Cl^-$  ocasionada por una mutación en el transportador CFTR (Thelin y Boucher, 2007). Los nucleótidos ATP y UTP pueden ser utilizados como aerosoles en el tratamiento de dicha enfermedad, debido a que aumentan la secreción de iones  $Cl^-$ . Actualmente, el compuesto INS37217, agonista del receptor  $P2Y_2$  derivado del dinucleótido  $Up_4U$ , se encuentra en fase clínica III. Este compuesto posee efectos más duraderos que otros nucleótidos, probablemente debido a su mayor resistencia a ser metabolizado por las células de las vías respiratorias o por enzimas presentes en el esputo (Yerxa y cols., 2002).

Estudios realizados con ratones deficientes en los receptores  $P2Y_2$  y  $P2Y_4$  han demostrado que ambos subtipos se expresan en el colon distal y que su activación induce la secreción transitoria de  $K^+$  a través de canales tipo BK (Matos y cols., 2005). Asimismo, el receptor  $P2Y_4$  media la secreción de  $Cl^-$  inducida por UTP en el yeyuno (Cressman y cols., 1999; Robaye y cols., 2003).

Los diadenosina polifosfatos  $Ap_4A$  y  $Ap_5A$  forman parte de la composición de las lágrimas. Además, ATP, UTP y  $Ap_4A$  estimulan la secreción lacrimal mediante la activación del receptor  $P2Y_2$  (Pintor y cols., 2002).

#### *Receptores P2Y en el sistema inmune.*

El ATP induce la diferenciación de las células HL-60, células de leucemia promielocíticas, a neutrófilos de manera más potente que el ADP o el AMP (Conigrave y cols., 2000). Este proceso está mediado por el receptor  $P2Y_{11}$  a través de la activación de la adenilato ciclasa a través de una proteína  $G_s$ . Además, el tratamiento con ATP provoca un

aumento de la expresión de este receptor (Communi y cols., 2000b). Por tanto, el receptor P2Y<sub>11</sub> parece estar involucrado en la hematopoyesis y podría ser una diana farmacológica para el tratamiento de distintos tipos de leucemia y neutropenia.

El ATP y el TNF $\alpha$  tienen efectos sinérgicos en la maduración de las células dendríticas. Diversos estudios han demostrado que la acción del ATP esta mediada por el receptor P2Y<sub>11</sub> (Schnurr y cols., 2000; Wilkin y cols., 2001).

En células dendríticas ADP induce la movilización de calcio, la activación de las ERKs, la inhibición de la producción de IL-12, y a diferencia de ATP $\gamma$ S, potencia la secreción de IL-10. Estos efectos parecen estar mediados en parte por el receptor P2Y<sub>13</sub>, cuya presencia en monocitos, células dendríticas y células T ha sido descrita (Zhang y cols., 2002; Marteau y cols., 2004).

El receptor P2Y<sub>14</sub> también parece estar implicado en la respuesta inflamatoria e inmune, ya que se ha identificado en células madre hematopoyéticas de médula ósea, donde está implicado en procesos de migración. A diferencia de estas células, su presencia no ha sido detectada en otras poblaciones de células madre, por ejemplo, en el cordón umbilical (Lee y cols., 2003a).

#### *Receptores P2Y en el sistema nervioso.*

En sistema nervioso los receptores P2Y regulan numerosos procesos en condiciones fisiológicas y patológicas. Por ejemplo, el receptor P2Y<sub>12</sub>, que como ya se ha comentado regula canales iónicos, media la inhibición de la liberación de noradrenalina en neuronas simpáticas a través de la inhibición de canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje (Lechner y cols., 2004).

Existen numerosos trabajos que confirman la importancia de los receptores P2Y en neurogénesis. Durante el desarrollo embrionario existe una intensa actividad proliferativa en la zona ventricular de la corteza cerebral. Dicha proliferación depende de la propagación de ondas de calcio entre células de la glía radial, tipo celular que aparece de manera transitoria en la etapa embrionaria y que dirige la migración neuronal y de las que derivan los progenitores de las neuronas piramidales de corteza. Dichas ondas se generan de manera espontánea y están mediadas por hemicanales formados por conexinas y por el receptor P2Y<sub>1</sub> que induce la salida de calcio de los reservorios intracelulares (Weissman y cols., 2004).

Estudios con cultivos derivados de neuroesferas obtenidas a partir de la región subventricular, zona en la que, junto al giro dentado en hipocampo, existe neurogénesis en el estado adulto (Alvarez-Buylla y Lim, 2004), han demostrado que los receptores P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>2</sub> potencian la proliferación celular inducida por factores de crecimiento (Mishra y cols., 2006). Los progenitores neurales expresan receptores P2Y y además liberan ATP mediante ráfagas. Diversos estudios han puesto de manifiesto que los nucleótidos actúan como señales proliferativas para estas células al tiempo que inhiben su diferenciación a neuronas y células gliales (Lin y cols., 2007). Sin embargo, según otros estudios, los receptores P2Y, entre ellos

el receptor P2Y<sub>1</sub>, inhiben la proliferación y expansión de las neuroesferas primarias (Stafford y cols., 2007). Estas diferencias pueden deberse a que, en los sucesivos pasos del cultivo, se produzcan modificaciones en la señalización de algunos receptores o en la expresión de las ectoenzimas presentes en la superficie de las células.

La activación de los receptores P2Y<sub>4</sub> y P2Y<sub>6</sub> potencia la proliferación de células madre neurales mesencefálicas inducida por factores de crecimiento, mientras que en ausencia de éstos, UTP y UDP provocan la diferenciación a neuronas dopaminérgicas (Milosevic y cols., 2006).

En caso de daño o muerte celular, las células de la microglía, células inmunes del cerebro, migran rápidamente hacia la zona dañada para fagocitar y eliminar los restos celulares. El ATP liberado en dicha región induce cambios en la movilidad de la microglía, actuando como agente quimioatrayente a través de diferentes receptores P2, tanto P2Y como P2X (Honda y cols., 2001; Nasu-Tada y cols., 2005; Ohsawa y cols., 2007). En estas células también se ha detectado la expresión del receptor P2Y<sub>6</sub>, cuyos niveles se incrementan cuando se produce daño neuronal. La activación de este receptor por UDP provoca un aumento de la fagocitosis (Koizumi y cols., 2007).

Los receptores P2Y también están involucrados en la percepción del dolor. Así, en sistemas de expresión heterólogos, se ha comprobado que la activación del receptor P2Y<sub>1</sub> induce la fosforilación dependiente de PKC del receptor de capsaicina, VR1, disminuyendo el umbral de activación por temperatura de dicho receptor desde los 42°C a los 35°C (Tominaga y cols., 2001). Estudios posteriores con animales deficientes en los receptores P2Y<sub>1</sub> y VR1 han puesto de manifiesto que el receptor P2Y<sub>2</sub> es el responsable de la hiperalgesia termal inducida por ATP (Moriyama y cols., 2003).

#### *Receptores P2Y en el mantenimiento de del tejido oseo.*

Los nucleótidos están implicados en la formación del hueso ya que el ATP inhibe la actividad de los osteoblastos al tiempo que estimula la función y la formación de los osteoclastos a través de diferentes receptores P2Y (Hoebertz y cols., 2002). Trabajos recientes han puesto de manifiesto que el efecto sobre estos últimos puede estar mediado por la IL-6, molécula sintetizada por los osteoblastos en respuesta al ATP y que induce la formación y diferenciación de los precursores de osteoclastos (Ihara y cols., 2005).

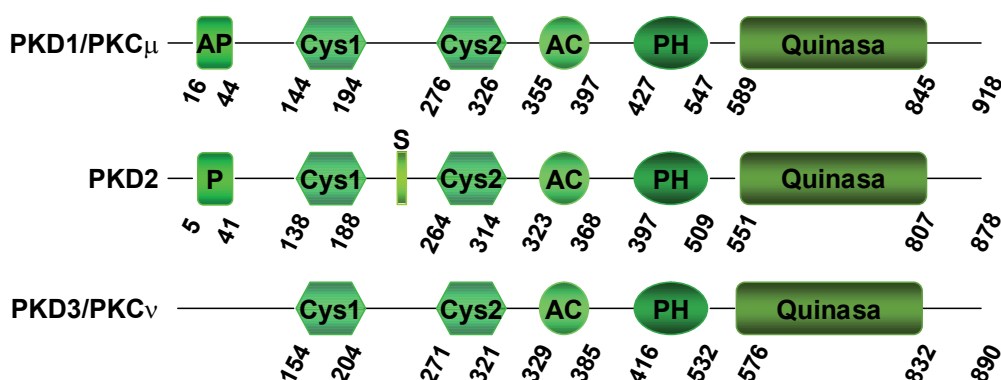
## 2.- PROTEÍNA QUINASA D.

La proteína quinasa D (PKD) es una Ser/Thr quinasa cuya clasificación ha variado a lo largo del tiempo. En un principio, se consideró una isoforma atípica de PKC, posteriormente, fue incluida dentro de la familia AGC, proteínas quinasas reguladas por nucleótidos como PKA (proteína quinasa A), PKG (proteína quinasa G) y PKC (proteína quinasa C), y actualmente, debido a la homología entre su dominio catalítico y el de la calcio calmodulina quinasa (CaMK) se considera una nueva familia de quinasas dentro del grupo de las CAMKs (Rozengurt y cols., 2005).

Existen tres isoformas de PKD, PKD1 y su homólogo humano PKC $\mu$ , PKD2 y PKD3 también denominada PKD $\nu$ .

### 2.1.- Estructura y función de los diferentes dominios estructurales.

La proteína quinasa D presenta una estructura formada por diferentes subdominios (figura 12), que está íntimamente ligada a su función catalítica, a su regulación y a su localización intracelular.

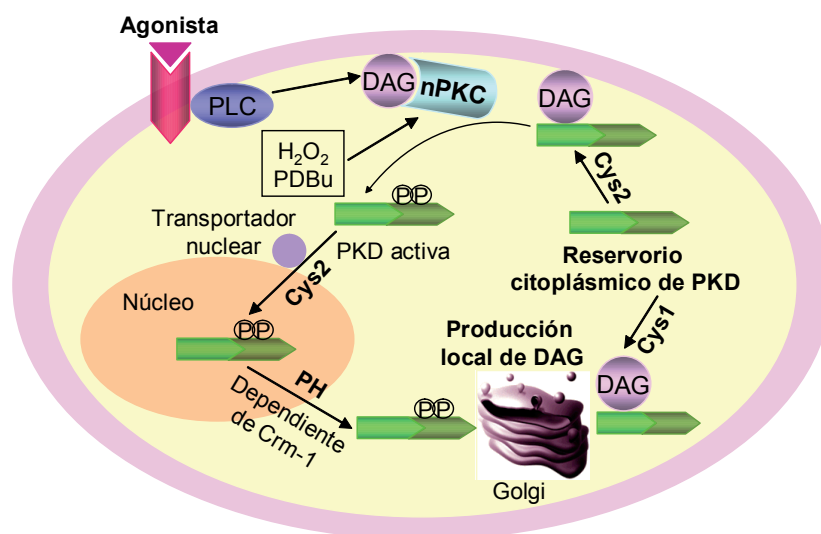


**Figura 12.- Representación de la estructura de los miembros de la familia PKD.** Los números indican la posición de los aminoácidos. AP: dominio rico en alanina y prolina. P: dominio rico en prolina. S: dominio rico en serina. Cys1 y Cys 2: dedos de zinc ricos en cisteína. AC: dominio rico en aminoácidos ácidos. PH: dominio de homología a pleckstrina. Quinasa: dominio catalítico con actividad quinasa. La figura está basada en la publicada por Van Lint y cols., (2002) en Trends in Cell Biology.

Esta proteína posee un dominio regulador, situado en la región N-terminal, y otro catalítico, localizado en C-terminal donde se localiza una región, denominada bucle de activación, cuya fosforilación en determinados residuos es necesaria para la activación de la enzima (Rykx y cols., 2003). El dominio regulador ejerce un efecto inhibitorio sobre el dominio catalítico, de tal modo, que la delección o mutación de distintas regiones del primero conduce a la activación constitutiva de PKD. Las tres isoformas de PKD poseen, en su

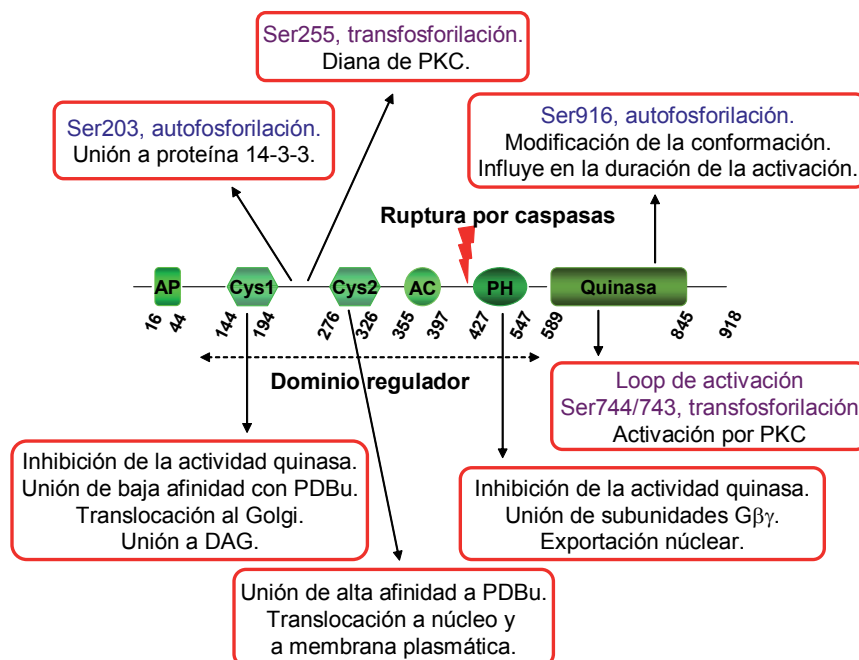
dominio regulador, dos dedos de zinc (Cys1 y Cys2), secuencias ricas en cisteína, y una región de homología a pleckstrina (PH), que junto con el dominio catalítico son las regiones más conservadas. El orden en el grado de homología es dominio catalítico > Cys1 > Cys2 > PH. Entre estas regiones se intercalan otras con mayor grado de variabilidad que confieren las propiedades específicas a cada subtipo de PKD. Algunas diferencias estructurales entre las tres isoformas son la ausencia del dominio hidrofóbico en la región N-terminal de PKD3 o la presencia de una secuencia extra rica en serina en PKD2.

En células en reposo, PKD1 se encuentra mayoritariamente en el citosol y una pequeña proporción en el Golgi, mientras que en células especializadas también se localiza en la mitocondria y en los gránulos de secreción (Storz y cols., 2000; Matthews y cols., 2000). Cuando las células se estimulan con agonistas de receptores que activan la fosfolipasa C (PLC), PKD1 se transloca desde el citosol a distintos compartimentos celulares, a la membrana, al núcleo o al aparato de Golgi (figura 13). Por ejemplo, la activación de receptores acoplados a proteínas G, tales como los receptores de neuropéptidos, induce una translocación rápida y reversible de PKD a la membrana donde se activa. A continuación, se disocia rápidamente, volviendo al citosol y se aumenta la velocidad de su transporte al núcleo, produciéndose una acumulación nuclear (Rey y cols., 2003).



**Figura 13.- Transporte nucleoplasmático y translocación al Golgi de PKD1.** Tras un estímulo que induzca la formación de DAG, PKD se transloca desde el citosol a la membrana plasmática, debido a la interacción del dominio Cys2 con DAG. PKD es fosforilada en el bucle de activación por nPKC, se activa y se disocia rápidamente de la membrana. El regreso al citosol va seguido de la acumulación de PKD en el núcleo, que está mediada por el dominio Cys2. La exportación desde el núcleo requiere la participación del dominio PH y tiene lugar mediante un mecanismo dependiente de Crm-1. El reclutamiento de PKD al Golgi depende del aumento local de la producción de DAG y esta mediado por el dominio Cys1. La figura está basada en la publicada por Rykx y cols. (2003) en FEBS Letters.

En la translocación de PKD a las distintas localizaciones subcelulares están implicados dominios concretos de la enzima, que interaccionan de manera rápida y reversible con lípidos y proteínas presentes en los distintos compartimentos (figura 14).



**Figura 14- Representación de las funciones de los dominios de PKD1.** El dominio regulador abarca los residuos 1-588. En esta región existen diversos subdominios cuyas funciones se indican en las cajas junto con los sitios de fosforilación. La figura está basada en la publicada por Van Lint y cols. (2002) en Trends in Cell Biology.

PKD2 presenta una distribución muy similar a PKD1. Sin embargo, PKD3 se localiza tanto en núcleo como en citoplasma de las células en reposo. Existe un intercambio continuo entre ambos compartimentos a través de un mecanismo dependiente de un transportador nuclear y de una vía de exportación nuclear dependiente de la proteína Crm-1.

## 2.2.- Mecanismos de activación de PKD.

La activación de PKD puede producirse mediante tres vías diferentes:

1.- Mediante la fosforilación de varios residuos (Iglesias y cols., 1998). En PKD1 existen cinco residuos susceptibles de fosforilación, dos en el dominio regulador (Ser<sup>203</sup> y Ser<sup>255</sup>), dos en el dominio catalítico (Ser<sup>744</sup> y Ser<sup>748</sup>) y uno en el extremo C-terminal (Ser<sup>916</sup>) (Vertommen y cols., 2000; Waldron y cols., 2001). Estos residuos pueden ser auto o transfosforilados, figura 14. La activación de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) o receptores tirosina quinasa, inducen la formación de diacilglicerol (DAG) vía fosfolipasa C (PLC) y la activación de PKCη y PKCε, que fosforilan los residuos Ser<sup>744</sup> y Ser<sup>748</sup> de PKD1,

los cuales forman parte del bucle de activación localizado en el dominio catalítico de la enzima. Se ha descrito que el residuo Ser<sup>748</sup> puede autofosforilarse lentamente, lo cual podría facilitar la fosforilación del residuo Ser<sup>744</sup> por PKCε (Waldron y Rozengurt, 2003). Los residuos Ser<sup>203</sup> y Ser<sup>916</sup> son sitios de autofosforilación, mientras que la Ser<sup>255</sup> es fosforilada por PKCs o por alguna quinasa activada por éstas. También se ha identificado un residuo en el dominio PH (Tyr<sup>463</sup>) cuya fosforilación por Abl provoca la activación de PKD a través de proteínas Src (Storz y Toker, 2003).

En PKD2 se han identificado tres sitios susceptibles de fosforilación, Ser<sup>706</sup> y Ser<sup>710</sup> en el dominio catalítico y Ser<sup>876</sup> en la región C-terminal, equivalentes a los residuos Ser<sup>744</sup>, Ser<sup>748</sup> y Ser<sup>916</sup> de PKD1 (Sturany y cols., 2001; Sturany y cols., 2002). Sin embargo, PKD3 parece que no posee ningún residuo que pueda ser fosforilado en el extremo C-terminal, aunque, al igual que PKD1 y PKD2, sí presenta dos sitios de fosforilación en el dominio catalítico, los residuos Ser<sup>731</sup> y Ser<sup>735</sup>.

2.- Mediante la interacción con las subunidades Gβγ a través del dominio de homología a pleckstrina (Jamora y cols., 1999). Este mecanismo juega un papel importante en el transporte de proteínas desde el Golgi a la membrana, proceso en el que la activación de PKD requiere la participación de PKCη asociada a este orgánulo (Diaz Anel y Malhotra, 2005).

3.- La tercera vía de activación de PKD tiene lugar por proteólisis llevada a cabo por caspasas activadas por sustancias genotóxicas que inducen apoptosis. Como consecuencia de la ruptura proteolítica se libera gran parte del dominio regulador generándose un fragmento de 60 KDa catalíticamente activo (Haussermann y cols., 1999; Endo y cols., 2000).

Por otro lado, la proteína 14-3-3 puede interaccionar con PKD1 inhibiendo su actividad quinasa (Hausser y cols., 1999).

### **2.3.- Vías de señalización intracelular e importancia fisiológica.**

Las diferentes localizaciones intracelulares de PKD le permiten regular numerosos procesos desde el tráfico de proteínas intracelular hasta proliferación, diferenciación, apoptosis o motilidad celular.

#### **2.3.1.- Proliferación, diferenciación y apoptosis.**

La expresión de PKD ha sido asociada a la proliferación celular en distintos tipos y líneas celulares como los queratinocitos, células de carcinoma de piel de ratón y fibroblastos NIH3T3 (Rennecke y cols., 1999). Se ha comprobado que la sobreexpresión de PKD potencia la síntesis de DNA inducida por bombesina, vasopresina o ésteres de forbol (Zhukova y cols., 2001). El factor de crecimiento del endotelio vascular induce la activación de las ERKs y la proliferación de células endoteliales a través de PKD (Wong y Jin, 2005). Este acoplamiento a la vía de las ERKs tiene lugar a través de la activación secuencial de Raf y MEK (Hausser y cols., 2001), mediante un mecanismo por el cual PKD1 fosforila a RIN1, proteína de unión



a Ras, disminuyendo la interacción entre ambas proteínas e incrementando la eficacia de la unión de Ras y Raf (Wang y cols., 2002).

Otra de las proteínas de la familia de las MAPKs que puede ser regulada por PKD1 es la quinasa del extremo N-terminal de c-Jun (JNK). Se ha propuesto que PKD1 inhibe la activación de esta cascada inducida por EGF a través de un mecanismo que implica la fosforilación del receptor de este factor de crecimiento (Bagowski y cols., 1999). Además, la sobreexpresión de PKD1 reduce la fosforilación inducida por EGF del residuo Ser<sup>63</sup> de c-jun (Hurd y Rozengurt, 2001). Mas recientemente, se han identificado diferentes residuos de c-jun que pueden ser fosforilados por PKD (Waldron y cols., 2007). La regulación de ambas cascadas de las MAPKs podría estar implicada en la proliferación no deseada de las células sometidas a estrés.

Relacionado con estos efectos proliferativos, PKD también induce respuestas antiapoptóticas en células tumorales (Trauzold y cols., 2003). La sobreexpresión de PKD1 en la línea celular de fibroblastos de ratón L-929 y en las células HeLa reduce la sensibilidad a la apoptosis inducida por TNF, este fenómeno está relacionado con el aumento de la expresión de genes que codifican proteínas que inhiben la apoptosis (Johannes y cols., 1998). Por el contrario, la proteólisis PKD1 por caspasas inducida por sustancias genotóxicas o por radiaciones  $\gamma$  aumenta la sensibilidad a la apoptosis (Endo y cols., 2000).

PKD también está implicada en procesos de diferenciación, por ejemplo, participa en la diferenciación de los osteoblastos y en la formación del hueso (Celil y Campbell, 2005).

Debido a su capacidad de aumentar la proliferación celular PKD está implicada en diversas enfermedades de la piel caracterizadas por una hiperproliferación celular, por ejemplo en carcinomas de células basales o psoriasis, donde se han observado alteraciones en su patrón de expresión en las diferentes capas epidérmicas o una expresión muy elevada (Ristich y cols., 2006). Asimismo, PKD puede fosforilar a las histonas deacetilasas de clase II que modulan la expresión génica y cuya desregulación está asociada a enfermedades musculares y a fallos cardíacos, así mediante la fosforilación de la histona deacetilasa 5 PKD está involucrada en la hipertrofia cardíaca dependiente de agonista (Vega y cols., 2004).

### **2.3.2.- Estrés oxidativo.**

PKD1 es un importante sensor de estrés oxidativo. En la activación de PKD inducida por ROS (especies reactivas de oxígeno) están implicadas las proteínas Src y Abl. Src fosforila a PKD en diferentes residuos facilitando la interacción con PKC $\delta$ , que regula la actividad de PKD1 en respuesta a estrés (Waldron y Rozengurt, 2000; Storz y Toker, 2003; Doppler y Storz, 2007). A su vez, PKD activa la cascada de IKK-NF- $\kappa$ B, induciendo la expresión de la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (MnSOD), que lleva a cabo la destoxificación de ROS (Storz y cols., 2004; Storz y cols., 2005).



### **2.3.3.- Extensión de las neuritas y diferenciación neuronal.**

Existe un gran número de evidencias que sugieren que la PKD podría estar implicada en la extensión de neuritas y diferenciación neuronal. La primera de ellas es que el único sustrato fisiológico de PKD identificado hasta el momento, la proteína Kidins220, se acumula en las extensiones de las neuritas, donde es transportada mediante un mecanismo dependiente de quinesina-1 (Iglesias y cols., 2000; Bracale y cols., 2007). Otra no menos importante es el hecho de que Kidins220 también identificada como ARMS, proteína transmembrana con dominios repetidos de anquirina, interacciona y es sustrato de receptores implicados en la supervivencia neuronal, guía axonal y morfogénesis tales como los receptores de efrinas y neurotrofinas (Kong y cols., 2001; Arevalo y cols., 2004; Chang y cols., 2004). Tanto los receptores de neurotrofinas como Kidins220 se localizan en regiones específicas de la membrana plasmática ricas en lípidos de baja densidad, zonas a las cuales se transloca PKD1 después de su activación (Cabrera-Poch y cols., 2004). Recientemente, también se ha puesto de manifiesto que Kidins220 posee en el extremo C-terminal dominios de interacción con proteínas PDZ, proteínas que participan en la organización de la sinapsis.

### **2.3.4.- Motilidad, invasión y adhesión celular.**

PKD desempeña un papel esencial en los procesos de migración celular, invasión y adhesión celular. Por ejemplo, se ha comprobado que durante la migración de los fibroblastos se forman unas estructuras denominadas lamelipodios, que son extensiones de las células en las que se desplaza casi todo el citoplasma hacia la zona de avance. Este proceso requiere un transporte anterógrado de proteínas desde el *trans*-Golgi a la membrana plasmática, proceso en el que está implicado PKD (Prigozhina y Waterman-Storer, 2004). PKD también promueve el reciclamiento de las integrinas  $\alpha v \beta 3$ , así como su reclutamiento para la formación de nuevas adhesiones focales que se requieren para la migración celular (Woods y cols., 2004).

PKD también regula la invasión de los tejidos por células tumorales (Qiang y cols., 2004). En el cáncer de mama, se ha demostrado que la invasión tiene lugar mediante rotura tisular, la célula tumoral emite una serie de prolongaciones denominadas invadopodias, donde tiene lugar una elevada degradación de las proteínas de la matriz extracelular, lo que facilita la invasión del tejido huésped. En estas estructuras PKD1 forma complejos con otras proteínas como la cortactina (proteína de unión a actina), la paxilina (sustrato de proteínas tirosina quinasas) y la proteína de adhesión focal (Bowden y cols., 1999). En el cáncer de próstata avanzado PKD modula la movilidad y la adhesión celular mediante la fosforilación de la cadherina E (Jaggi y cols., 2005).

### **2.3.5.- PKD en el sistema inmune.**

La proteína quinasa D también parece estar implicada en la respuesta inmune. Su presencia en células T y en células B (Matthews y cols., 2003), junto con la detección de

Kidins220 en linfocitos T, con una distribución polarizada al igual que ocurre en neuronas, sugiere que ambos tipos celulares podrían compartir los mecanismos moleculares responsables de los procesos de migración y quimiotaxis (Riol-Blanco y cols., 2004).

Se ha demostrado que el entrecruzamiento de los receptores BCR y TCR, receptores de las células B y T respectivamente, induce la activación de PKD mediante un mecanismo dependiente de PLC $\gamma$  y de la proteína tirosina quinasa Syk (Sidorenko y cols., 1996; Johannes y cols., 1999). En el caso de las células B, parece existir una regulación mutua entre PKD y el receptor BCR. La presentación antigénica produce la activación de PKD1 y su redistribución en la membrana plasmática (Matthews y cols., 2000).

PKD también está implicada en la selección negativa de los timocitos (Bollag y cols., 2004). En este estudio PKD fosforila a la histona deacetilasa de clase II HDAC7, induciendo la expresión de Nurr77 y apoptosis.

### **2.3.6.- Regulación del transporte de proteínas desde el *trans*-Golgi a la membrana plasmática.**

Las proteínas de membrana se sintetizan en los ribosomas adheridos al retículo endoplásmico, se transportan al Golgi, donde se termina el proceso de maduración, y una vez en el *trans*-Golgi (TNG) se distribuyen en diferentes vesículas en función de su lugar de destino. En células polarizadas existe una clasificación adicional dependiendo de si las proteínas están destinadas a la membrana basolateral o a la cara apical. Existen numerosos trabajos que ponen de manifiesto que la PKD está implicada en el transporte de proteínas a la membrana plasmática, aunque en el caso de células polarizadas, parece que únicamente interviene en el transporte de las proteínas de la membrana basolateral. Diversos estudios funcionales han demostrado que las diferentes isoformas de PKD regulan el transporte a membrana de distintos tipos de vesículas, debido probablemente a que reconocen sustratos específicos (Yeaman y cols., 2004). Por ejemplo, la localización de Kidins220 en la membrana está regulada por PKD1 y PKD2 a través de un motivo de unión PDZ presente en el extremo C-terminal de ambas enzimas que no aparece en PKD3. En la posición -2 de dicha secuencia se encuentra el residuo Ser<sup>916</sup>, cuya autofosforilación o transfosforilación homóloga es esencial para la correcta localización de Kidins220 (Sanchez-Ruiloba y cols., 2006).

Según el modelo propuesto para la regulación del transporte de proteínas ejercido por PKD1, la enzima es reclutada al *trans*-Golgi como consecuencia de un aumento local de los niveles de DAG y su fosforilación promueve la escisión de las vesículas de transporte (Jamora y cols., 1999; Liljedahl y cols., 2001; Ghanekar y Lowe, 2005). La activación de PKD en el TNG está mediada por subunidades G <sub>$\beta\gamma$</sub> , parece ser que por los subtipos G <sub>$\beta_1\gamma_2$</sub>  y G <sub>$\beta_3\gamma_2$</sub> . Estas subunidades activan a la PKC $\eta$ , expresada en el TGN, que fosforila a PKD (Díaz Anel y Malhotra, 2005). En este caso, PKD1 permanece anclada al *trans*-Golgi y recluta diferentes efectores que forman un complejo que regula la generación de lípidos que promueven la escisión vesicular. Entre las enzimas que pueden estar implicadas se

encuentran la fosfatidilinositol 4-quinasa y la fosfatidilinositol 4-fosfato 5-quinasa cuya participación en el transporte a membrana y asociación a PKD1 han sido descritas (Hsuan y cols., 1998; Nishikawa y cols., 1998). Otra candidata es la diacilglicerol quinasa, cuya activación conduce a la formación de ácido fosfatídico, un lípido que induce la escisión de las vesículas (Schmidt y cols., 1999).

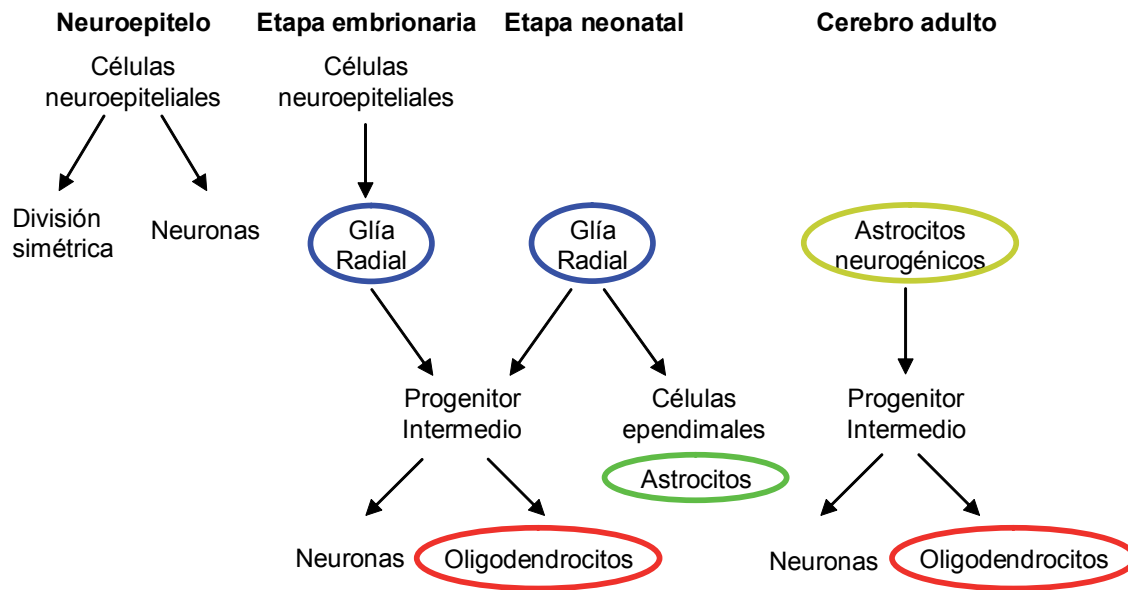
### 3.- LAS CÉLULAS GLIALES.

#### **3.1.- Tipos de células gliales y sus funciones.**

En el sistema nervioso central existen principalmente dos tipos celulares, las neuronas y las células de la glía, mucho más abundantes. Las células gliales se clasifican en macroglía, que a su vez se dividen en astrocitos y oligodendrocitos, y microglía. Existen dos tipos de astrocitos, los protoplásmicos o tipo 1, que poseen prolongaciones ramificadas y se encuentran principalmente en la sustancia gris dispersos entre los cuerpos neuronales, y los astrocitos fibrosos o tipo 2, localizados mayoritariamente en la sustancia blanca situados entre los axones mielinizados. Los astrocitos suelen tener entre cinco y ocho prolongaciones principales con ramificaciones más delgadas uniformemente distribuidas. Tanto el soma como las prolongaciones principales están enriquecidas en la proteína glial fibrilar ácida (GFAP), mientras que las ramificaciones más finas son GFAP negativas. Por ello, en las tinciones inmunocitoquímicas con un anticuerpo que reconoce a esta proteína, los astrocitos aparecen con forma estrellada a pesar de ser cúbicos o redondeados (Bushong y cols., 2002; Ogata y Kosaka). La distribución de los astrocitos en el sistema nervioso central presenta un alto grado de organización. Las células están muy separadas y no existe contacto alguno entre los somas ni entre las prolongaciones de diferentes astrocitos. De este modo, las sinapsis de una determinada región están controladas por un único astrocito. Además, la retina y el cerebelo poseen dos tipos especializados de células radiales denominados células de Müller y glía de Bergmann, respectivamente.

Durante el desarrollo embrionario aparece, de manera transitoria, otro tipo de célula glial, la glía radial que es la responsable de guiar la migración de las neuronas recién formadas a sus localizaciones definitivas. Además, constituye la población más importante de progenitores primarios de las neuronas de la corteza cerebral, y probablemente también actúe como precursor neuronal en otras áreas cerebrales (Anthony y cols., 2004; Merkle y Alvarez-Buylla, 2006). En mamíferos, este tipo celular desaparece poco después del nacimiento y su papel como precursor neural es adoptado por otras células fenotípicamente similares a los astrocitos.

Respecto al origen de las células gliales, los astrocitos y oligodendrocitos son de origen neuroectodérmico, y al igual que las neuronas, se originan a partir de precursores neurales localizados en una región denominada zona ventricular situada en los laterales de los ventrículos cerebrales (Anthony y cols., 2004; Merkle y cols., 2004). En la figura 15, se muestra un esquema de las células precursoras neurales y su progenie en las diferentes etapas del desarrollo. Por el contrario, la microglía es de naturaleza mesodérmica, se forma en etapas tempranas del desarrollo embrionario a partir de precursores mieloides diferentes de los que originan los monocitos (Chan y cols., 2007).



**Figura 15.- Esquema de las células precursoras neurales y su progenie durante las diferentes etapas del desarrollo en el lóbulo temporal.** En las primeras etapas del desarrollo, el sistema nervioso central es una estructura tubular formada por células neuroepiteliales, que se dividen de manera simétrica en la superficie de los ventrículos. Al mismo tiempo, empiezan a generarse las primeras neuronas. Durante el estado embrionario, las células neuroepiteliales se diferencian a glía radial. Estas células gliales generan neuronas estriatales y oligodendrocitos y sirven de guía en la migración de los neuroblastos. En el periodo neonatal temprano, todavía persiste la glía radial a partir de la cual se forman neuronas, oligodendrocitos, células endodiales y astrocitos. En la etapa adulta, en la zona subventricular (SVZ), existen astrocitos con actividad mitogénica, que conservan algunas de las características de la glía radial y a partir de los cuales se generan oligodendrocitos y algunos tipos neuronales.

Los distintos tipos de células gliales también difieren en sus funciones. De manera esquemática, se podrían citar que los oligodendrocitos son los responsables de la mielinización en el sistema nervioso central, al igual que las células de Schwan en el sistema nervioso periférico, aunque existen oligodendrocitos que no mielinizan, llamados oligodendrocitos perineurales, algunos de los cuales constituyen una forma adulta del precursor de oligodendrocitos (Miller, 1996). La microglía posee capacidad fagocítica y desempeña un papel inmunoprotector. En condiciones fisiológicas, estas células chequean el medio que las rodea en busca de estímulos que alteren la homeostasis y responden rápidamente cuando detectan un daño neural, extendiendo sus prolongaciones hasta llegar a la zona dañada con el objetivo de aislarla (Davalos y cols., 2005). Por último, los astrocitos, objeto de estudio de esta Tesis Doctoral, desempeñan numerosas funciones tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. En la tabla 4, se recogen las más importantes, que se desarrollarán más detenidamente en el siguiente apartado.

<b>Funciones clásicas</b>	Mantenimiento de la homeostasis del pH e iones Suministro energético de las neuronas Eliminación de sustancias tóxicas y de neurotransmisores Síntesis de precursores de neurotransmisores Integridad de la barrera hematoencefálica
<b>Nuevas funciones</b>	Modulación de la sinapsis Regulación de la sinaptogénesis Regulación de la neurogénesis en cerebro adulto Guía de los axones y migración neural Implicación en procesos inflamatorios y de respuesta inmune Modulación trófica de la reparación neural y regeneración axónica post-trauma

**Tabla 4.- Funciones de los astrocitos en condiciones fisiológicas y patológicas.** La tabla está basada en la publicada por Ransom y cols. (2003) en Trends in Neurosciences.

En todos los tipos de células gliales, incluso en la glía especializada y en la glía radial, se ha detectado la presencia de algún componente del sistema purinérgico, bien receptores de nucleótidos, receptores de adenosina y/o ectoenzimas, lo que confirma de nuevo la importancia de la señalización purinérgica en la fisiopatología del sistema nervioso (Burnstock, 2007). La identificación de los receptores de nucleótidos P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>2</sub> en la glía radial, que parecen estar implicados en la propagación de las ondas de calcio, esenciales para la correcta migración y diferenciación de los progenitores neurales, junto con la ectonucleotidasa NTPDase2 ha abierto nuevos horizontes en la señalización purinérgica (Weissman y cols., 2004; Mishra y cols., 2006).

### **3.2.- Importancia de los astrocitos en sistema nervioso.**

Durante mucho tiempo, el estudio de las células gliales quedó relegado a un segundo plano, debido en parte a que como dijo Santiago Ramón y Cajal en 1911: “¿Cuál es la función de las células gliales en el sistema nervioso? La respuesta todavía no se conoce, pero el problema es aún más grave porque permanecerá sin resolver durante muchos años hasta que los fisiólogos descubran nuevos métodos para abordarlo”. De este modo, hasta hace poco tiempo los astrocitos fueron considerados meros elementos de soporte de la función neuronal. Efectivamente, son los responsables de mantener el pH y las condiciones iónicas adecuadas, proporcionan glucosa y otros metabolitos a las neuronas, al tiempo que retiran los productos de desecho, no sólo metabólicos, sino también de la neurotransmisión, liberados por las neuronas al medio extracelular. Pero, en las dos últimas décadas, se han producido descubrimientos sorprendentes que han puesto de manifiesto la enorme importancia de este tipo de célula glial, que lejos de ser un elemento pasivo, participa en muchas de las

actividades cerebrales. Los astrocitos establecen un intercambio recíproco de información con las neuronas, controlan y modulan la actividad sináptica y parecen estar implicados en la sinaptogénesis.

Los astrocitos, a diferencia de las neuronas, se han considerado células no excitables. La estabilidad de su potencial de membrana puede deberse a que poseen un elevado número de canales de  $K^+$ . Sin embargo, frente a un determinado estímulo, estas células pueden comunicarse entre sí a través de las denominadas ondas de calcio. En un principio, se pensó que estas ondas se propagaban debido a la difusión de  $Ca^{2+}$  o de inositol 1,4,5-trifosfato a través de conexinas que conectan astrocitos adyacentes (Charles y cols., 1992). Sin embargo, posteriormente se observó que este tipo de comunicación podía producirse entre astrocitos no contiguos (Hassinger y cols., 1996), lo que sugirió que estaba mediada por una molécula extracelular, identificada poco después como el ATP (Arcuino y cols., 2002). Actualmente, se piensa que el ATP es liberado por un astrocito a través de conexinas y que éste a su vez actúa sobre los receptores P2Y de astrocitos próximos que se encuentren a una distancia de 300 - 400  $\mu m$ . Se piensa que estas señales de calcio podrían estar implicadas en el mantenimiento de la homeostasis del agua, en la regulación del flujo sanguíneo y en el paso de compuestos del metabolismo a través de la barrera hematoencefálica. Además de la propagación de las ondas de calcio, los astrocitos pueden sufrir oscilaciones espontáneas de la concentración de calcio intracelular, procedente de reservorios intracelulares, independientemente de la actividad neuronal y cuya función todavía no se conoce (Parri y cols., 2001; Nett y cols., 2002).

### 3.2.1.- Regulación de la transmisión sináptica.

Hasta hace muy poco tiempo se pensaba que en la sinapsis sólo participaban dos componentes, la neurona presináptica y la neurona postsináptica. Sin embargo, en las últimas décadas se ha demostrado que los astrocitos también participan activamente en la transmisión de la información nerviosa. De este modo, surgió el concepto de “sinapsis tripartita” (Araque y cols., 1999; Volterra y Bezzi, 2002).

Se ha puesto de manifiesto que los astrocitos expresan receptores para una amplia variedad de compuestos, como neuropéptidos, factores de crecimiento, endocannabinoides y neurotransmisores (glutamato, adenosina, GABA, ATP, histamina, noradrenalina o acetilcolina) (Syed y cols., 2007; Zhang y Neufeld, 2007; Aguado y cols., 2006). Estos receptores pueden estar acoplados a diferentes vías de señalización y su activación genera diferentes tipos de respuestas. Por ejemplo, en rodajas de hipocampo la estimulación eléctrica de las neuronas induce respuestas de calcio en los astrocitos en las que están implicados receptores de diferentes neurotransmisores (Porter y McCarthy, 1997; Shelton y McCarthy, 2000; Araque y cols., 2002). Dicho incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  en los astrocitos depende de la actividad sináptica, los astrocitos del *stratum radiatum* no responden cuando la estimulación de las colaterales de Schaffer es de baja frecuencia, pero sí cuando la estimulación es de



alta intensidad. Además, la estimulación prolongada o repetitiva de estos axones provoca en los astrocitos una respuesta oscilatoria que depende de la frecuencia e intensidad de la estimulación. Estas oscilaciones pueden constituir el código mediante el cual se controla la liberación de glutamato por los astrocitos (Pasti y cols., 2001; Araque y cols., 2002). En algunas ocasiones, la actividad sináptica induce respuestas espacialmente restringidas. En la glía de Bergmann, la estimulación moderada de las fibras paralelas induce respuestas de calcio únicamente en determinados microdominios celulares, al igual que ocurre con las oscilaciones espontáneas de la concentración de calcio observadas en astrocitos de hipocampo (Grosche y cols., 1999; Nett y cols., 2002).

Recientemente, Perea y Araque, (2005) han demostrado que un mismo astrocito es capaz de discriminar entre diferentes vías aferentes. La estimulación de las colaterales de Schaffer glutamatérgicas inducen respuestas de calcio en los astrocitos a través de receptores mGluR, mientras que la estimulación del *alveus*, con proyecciones glutamatérgicas y colinérgicas, provocan dichas respuestas mediante receptores muscarínicos de acetilcolina. La estimulación simultánea de ambas vías induce una respuesta en los astrocitos diferente a la suma de las señales de calcio inducida por cada vía por separado, lo que indica que la respuesta de los astrocitos está modulada a la vez por sinapsis glutamatérgicas y colinérgicas.

La comunicación neurona-glía es bidireccional. Al igual que las neuronas son capaces de modular la actividad de los astrocitos, éstos también regulan la actividad neuronal. Así, la estimulación de los astrocitos produce la despolarización de las neuronas adyacentes que en ocasiones generan potenciales de acción (Hassinger y cols., 1995; Araque y cols., 1999). Esta regulación está mediada por neurotransmisores liberados por la glía, principalmente glutamato y ATP. Estos “gliotransmisores” actúan tanto a nivel presináptico, inhibiendo o estimulando la liberación de neurotransmisores por las neuronas, como postsináptico (Koizumi y Inoue, 1997; Araque y cols., 1998; Koizumi y cols., 2003; Angulo y cols., 2004; Fellin y cols., 2004).

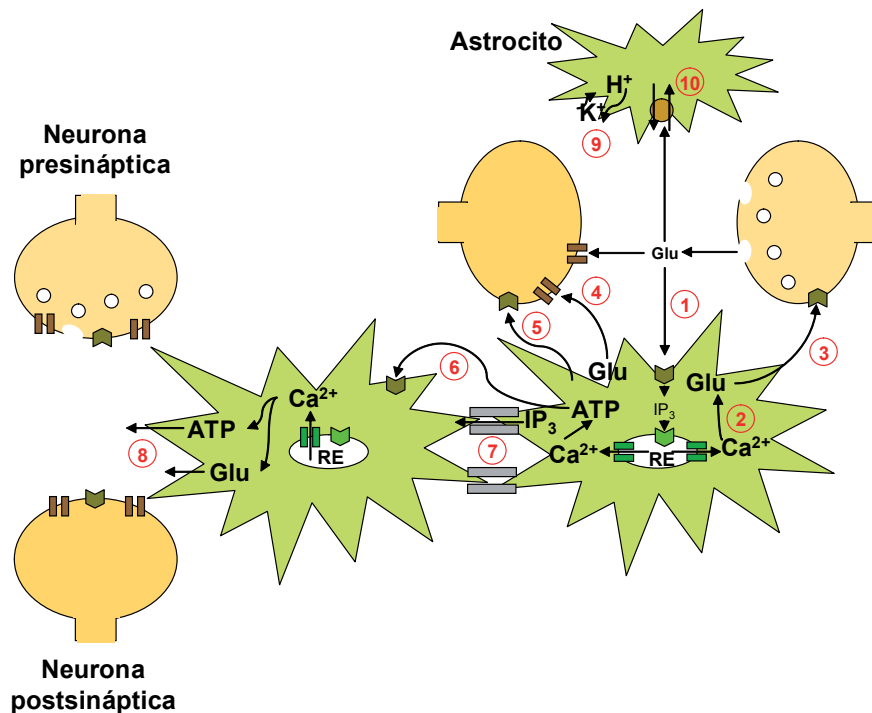
Los mecanismos implicados en la liberación de neurotransmisores por las células gliales no se conocen con detalle, aunque existen diversas hipótesis. Una de ellas propone un mecanismo de liberación exocitótico dependiente de calcio similar al descrito en neuronas, en el que podrían estar implicadas proteínas del complejo SNARE (Coco y cols., 2003; Kreft y cols., 2004; Zhang y cols., 2004; Bezzi y cols., 2004; Pangrsic y cols., 2007). Otros autores sugieren que la liberación de neurotransmisores podría tener lugar a través de canales aniónicos sensibles a la variación de volumen, conexinas o incluso a través receptores de nucleótidos (Mongin y Kimelberg, 2005; Ye y cols., 2003; Duan y cols., 2003; Fellin y cols., 2006; Domercq y cols., 2006). Incluso el ATP se podría liberar de los lisosomas en respuesta a determinados estímulos (Zhang y cols., 2007).

Existen otros mecanismos indirectos mediante los cuales los astrocitos pueden modular la sinapsis. Entre ellos se encuentran la captación de glutamato de la hendidura sináptica a través de los transportadores de aminoácidos, la liberación de cofactores como la



D-Ser o el control de las condiciones iónicas (Bergles y cols., 1999; Miller, 2004; Newman, 1996). En la figura 16 se esquematizan las diferentes vías de comunicación neurona-glía mediante las cuales los astrocitos regulan la actividad sináptica.

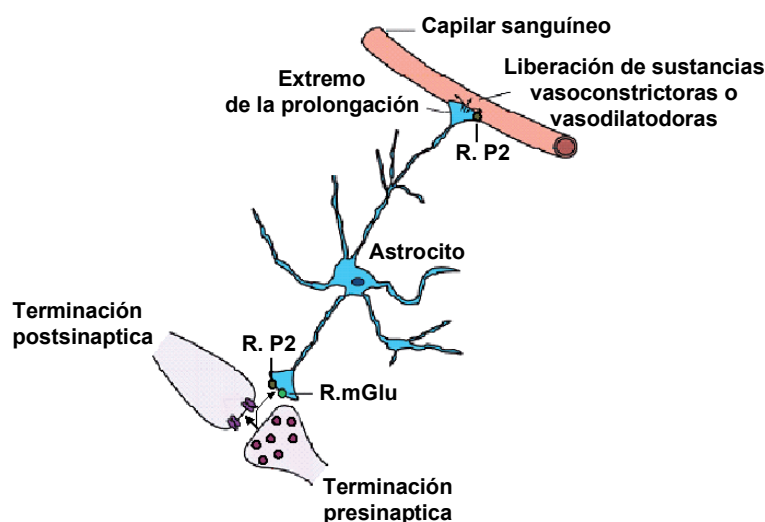
Por tanto, la comunicación neurona-glía es extremadamente compleja y no se limita a la interacción entre dos únicas células. En cerebro adulto, un solo astrocito puede contactar con más de 140.000 sinapsis. Además, debido a la propagación de las ondas de calcio, la información puede llegar a otras neuronas con las que no interacciona directamente.



**Figura 16.- Esquema de los diferentes mecanismos propuestos de la regulación de la transmisión sináptica por los astrocitos.** 1.- El glutámico liberado por las neuronas presinápticas activa a los receptores de glutámico expresados en la superficie de los astrocitos. 2.- Como consecuencia, se produce un incremento en la concentración de calcio intracelular que induce la liberación de glutámico por los astrocitos. 3.- El glutámico activa receptores metabotrópicos de las neuronas presinápticas, regulando así la liberación del neurotransmisor. 4.- Además, el glutámico activa receptores ionotrópicos de las neuronas postsinápticas, induciendo su despolarización. 5.- La estimulación de la glía también provoca la liberación de ATP que actúa sobre receptores purinérgicos de la superficie de las neuronas presinápticas. 6.- El ATP también puede activar receptores P2Y presentes en otros astrocitos, propagándose así las ondas de calcio, que también pueden llegar a los astrocitos adyacentes mediante la difusión de IP<sub>3</sub> a través de las conexinas (7). 8.- La activación de otros astrocitos, que liberan glutámico y ATP, permite la regulación de otras sinapsis alejadas. 9.- La glía también modula la transmisión sináptica mediante la regulación de las condiciones iónicas extracelulares o mediante la captura y retirada del glutámico de la hendidura sináptica (10). Esta figura se basa en la publicada por Newman (2003) en Trends in Neurosciences.

### 3.2.2.- Regulación de la microvasculatura cerebral.

Durante la actividad neuronal se produce un aumento local del flujo sanguíneo esencial para el correcto funcionamiento del cerebro (Bonvento y cols., 2002). Existen diversas hipótesis sobre cómo tiene lugar dicha regulación de la microvasculatura cerebral, proceso en el cual podrían estar implicados los astrocitos. Se ha postulado que los nucleótidos liberados por las neuronas provocan un incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  en las células gliales, que se propaga por el soma y las prolongaciones, estimulando la activación de la  $PLA_2$  implicada en la síntesis de sustancias vasodilatadores (ácido araquidónico,  $PGE_2$ ) y/o vasoconstrictoras (20-HETE) (Zonta y cols., 2003; Mulligan y MacVicar, 2004), figura 17. Se ha descrito que un único astrocito es capaz de regular la actividad de cientos de sinapsis y a su vez establecer contacto directo con las arteriolas o capilares del cerebro. De este modo que se realiza un ajuste muy fino del aporte de nutrientes dependiendo del grado de actividad neuronal. En el final de las prolongaciones, donde se establece contacto directo entre los astrocitos y los endotelios, se ha detectado la presencia de receptores de nucleótidos, tipo  $P2Y_2$  y  $P2Y_4$ , junto con la proteína conexina 43, lo que sugiere que podrían estar implicados en la regulación del flujo sanguíneo cerebral (Simard y cols., 2003).



**Figura 17.- Mecanismo de regulación de la vasculatura cerebral por los astrocitos.** El glutamato liberado por la neurona presináptica activa receptores ionotrópicos de glutamato (R. Glu) de la neurona presináptica y receptores metabotrópicos (R. mGlu) en los astrocitos. El incremento de la concentración de calcio inducida por el neurotransmisor se propaga por toda la célula hasta llegar al extremo de las prolongaciones del astrocito. Como consecuencia de dicho incremento en la concentración de calcio, se produce la síntesis de sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras que modulan el tono de la vasculatura cerebral. La figura ha sido obtenida de la revisión publicada por Parri y Crunelli (2003) en *Nature Neurosciences*.

### **3.2.3.- Regulación de la sinaptogénesis.**

La capacidad de formar sinapsis es una propiedad intrínseca de las neuronas. Sin embargo, en las últimas décadas se han acumulado evidencias suficientes para sugerir que las células gliales, particularmente los astrocitos, podrían estar implicados en el proceso de sinaptogénesis. En primer lugar, existe una relación temporal entre la diferenciación de los astrocitos y la sinaptogénesis, los astrocitos se originan al final del período embrionario y en etapas postnatales tempranas, y la formación de la sinapsis tiene lugar en las primeras semanas postnatales, aunque el papel de las células gliales podría variar dependiendo de la etapa del desarrollo. Así, se ha observado que en cultivos de neuronas de hipocampo embrionarias se requiere la interacción astrocito-neurona para que se inicie la sinaptogénesis, mientras que dicho contacto no es necesario para la formación postnatal de la sinapsis entre las células de ganglio de retina (Ullian y Barres, 2002; Hama y cols., 2004). En este último modelo, el número de sinapsis se ve incrementado en presencia de los astrocitos, sin que la supervivencia neuronal o el número de dendritas se vean afectados (Ullian y cols., 2001).

Otro hecho que avala la participación de los astrocitos en la sinaptogénesis es que, al igual que la estructura de las dendritas se modifica como consecuencia de la actividad sináptica, también se ha observado que las prolongaciones de los astrocitos que rodean las sinapsis presentan una alta movilidad, mientras que aquellas que contactan con el soma de las neuronas o con los vasos sanguíneos permanecen inmóviles (Hirrlinger y cols., 2004).

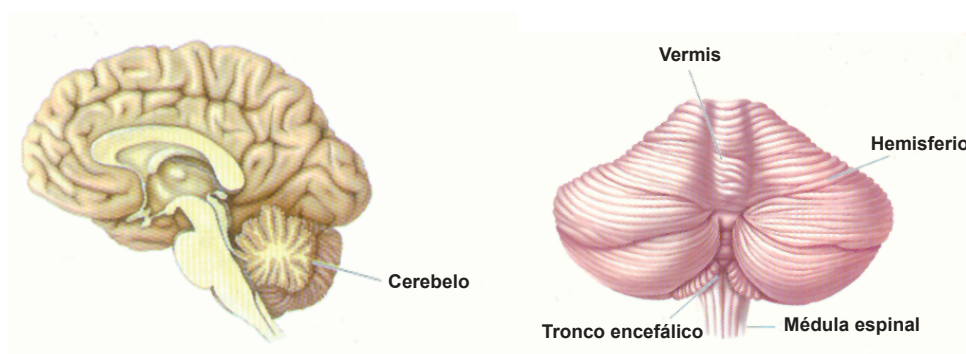
Entre los factores solubles liberados por los astrocitos con actividad sinaptogénica se encuentran el colesterol, el  $\text{TNF}\alpha$ , el factor de crecimiento neurotrófico dependiente de la actividad (ADNF), así como una proteína todavía no identificada denominada MARIA (muscarinic-acetylcholine-receptor inducing activity) y las trombospondinas (TPS-1 y 2) (Blondel y cols., 2000; Belmonte y cols., 2000; Gozes y Brenneman, 2000; Mauch y cols., 2001; Goritz y cols., 2005). Estas últimas se expresan durante el desarrollo del cerebro, coincidiendo con el proceso de mayor actividad sinaptogénica, y su expresión desaparece en el adulto (Christopherson y cols., 2005).

#### 4.- EL CEREBELO.

El cerebelo constituye una de las zonas más importantes del cerebro. Está presente en todos los vertebrados, incluso en los más antiguos. Así, la lamprea posee un cerebelo primitivo consistente en una especie de protuberancia del cerebro. Durante la evolución se han ido formando cerebelos de formas y tamaños diversos, de forma general, ocupa entre la tercera y cuarta parte del volumen craneal. Sin embargo, el patrón en que se hallan ordenadas las neuronas y sus conexiones no ha variado. Este órgano desempeña un papel crucial en la ejecución de los movimientos delicados y en la coordinación motora, pero también participa en otras muchas funciones, como son la memoria a corto plazo, la cognición superior, planificación y realización de tareas, control de los impulsos, mantenimiento de la atención y en el habla. Además podría estar implicado en determinadas enfermedades, por ejemplo, en esquizofrenia y autismo.

##### 4.1.- Anatomía e histología del cerebelo.

Anatómicamente, el cerebelo se encuentra en la parte posterior e inferior de la base del cráneo, situado en el tronco del encéfalo apoyado sobre los pedúnculos cerebelosos (superior, medio e inferior), mediante los que se comunica con el cerebro, con la protuberancia anular y con el bulbo raquídeo. Está formado por una sucesión de láminas o folias que discurren de forma transversal al eje longitudinal del cuerpo (figura 18).

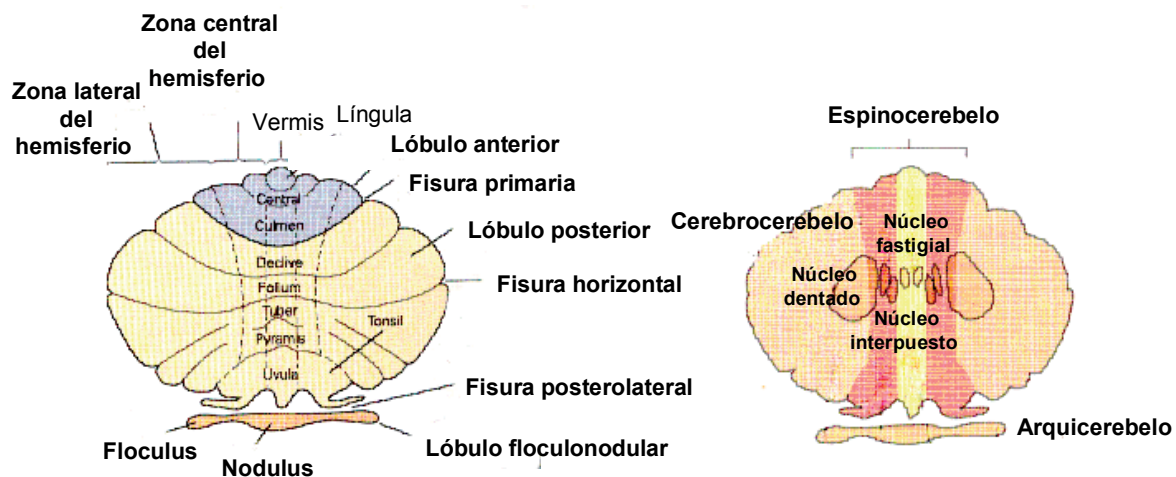


**Figura 18.- Localización del cerebelo respecto a otras estructuras del sistema nervioso central.**

El cerebelo se encuentra dividido sagitalmente en tres lóbulos separados por dos fisuras profundas, el lóbulo anterior y el lóbulo posterior, separados por la fisura primaria, y el lóbulo flóculonodular, separado de las anteriores por la fisura posterolateral. Los lóbulos se encuentran divididos a su vez en lobulillos, numerados del I al X. Filogenéticamente, la zona más reciente evolutivamente del cerebelo es el lóbulo posterior o neocerebelo, muy desarrollado en primates, formado por los dos hemisferios cerebelosos que se encuentran

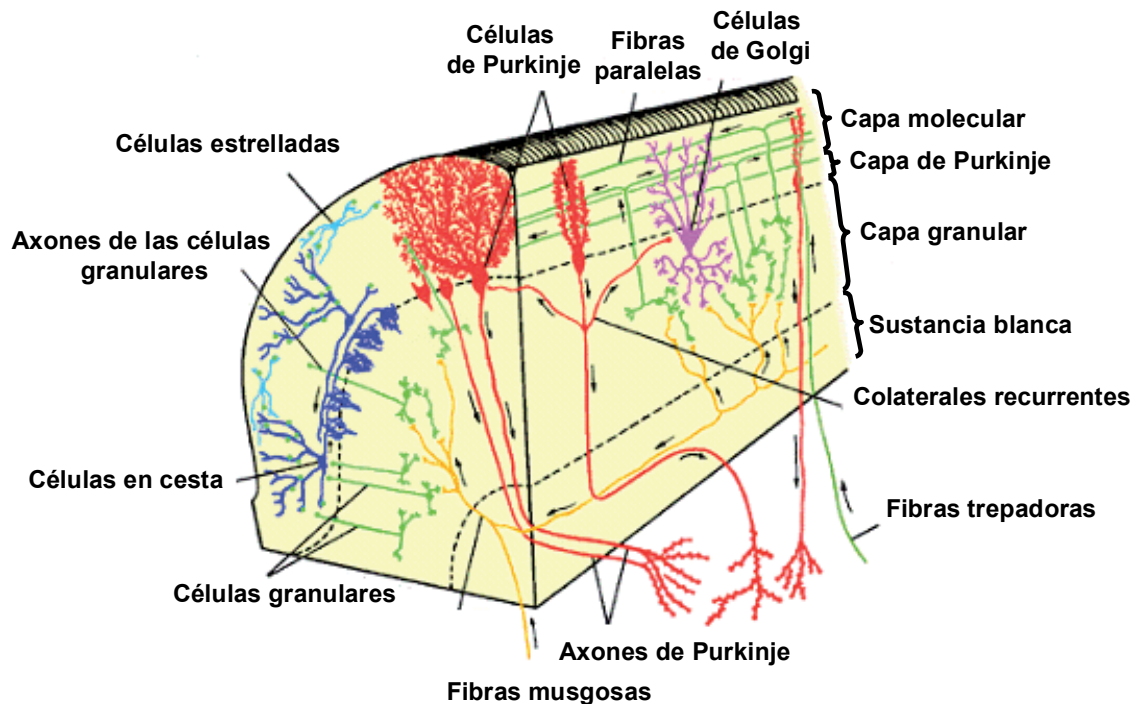
separados transversalmente por dos surcos poco profundos que delimitan la porción central denominada vermis. A los hemisferios cerebelares llegan la mayoría de señales enviadas desde las áreas motoras de la corteza cerebral, mientras que la vermis recibe la mayor parte de las señales nerviosas procedentes de las áreas somáticas del cuerpo y desempeña un papel esencial en la integración de los mecanismos posturales y subconscientes. Esta última zona es, junto con el lóbulo floculonodular o arquicerebelo, la parte más antigua del cerebelo.

Histológicamente, se distinguen dos zonas, la corteza cerebelosa, donde se localizan los somas de las neuronas y se establecen las sinapsis, y la sustancia blanca formada por los axones. Además, existen tres pares de núcleos profundos denominados dentado, fastigial e interpuesto, este último está formado a su vez por los núcleos globoso y emboliforme (figura 19).



**Figura 19.- Partes del cerebelo.** La fisura primaria separa al lóbulo anterior (paleocerebelo) del posterior (neocerebelo), mientras que el lóbulo floculonodular (arquicerebelo) se encuentra separado de los dos anteriores por la fisura posterolateral. Otras fisuras poco profundas subdividen los lóbulos anteriores en varios lobulillos. Dos surcos longitudinales crean una franja central denominada vermis, que separa los dos hemisferios cerebelosos. Estos a su vez constan de una región intermedia y una región lateral externa. Además existen tres pares de núcleos profundos denominados núcleos dentado, interpuesto y fastigial.

La corteza cerebelosa se divide en tres capas, que desde la superficie al interior se denominan molecular, intermedia o de células de Purkinje y granular, que contienen seis tipos de neuronas distintos, células de Purkinje, células granulares, células en cesta, células estrelladas, células de Golgi y células de Lugaro, así como células gliales, entre las que destacan la glía de Bergmann, microglía y oligodendrocitos (figura 20).



**Figura 20.- Organización general de la corteza cerebelosa.** El esquema muestra una circunvolución cerebelosa en sentido vertical. Se indican los principales tipos neuronales y las vías aferentes, así como su distribución y recorrido por las diferentes capas de la corteza cerebelosa.

El número de neuronas del cerebelo es cinco veces superior al del cerebro. Las células de mayor tamaño e impresionantes son las células de Purkinje. Sus somas se organizan en fila en la parte más interna de la capa media. Estas neuronas se caracterizan por su gran árbol dendrítico, que le permite establecer un número de sinapsis veinte veces superior al de las neuronas de la corteza del cerebro.

La capa más interna, denominada capa granular, está formada por las neuronas granulares, que envían sus prolongaciones a la capa externa, o capa molecular, donde se bifurcan en forma de T. Las dos ramas discurren paralelas a los surcos del cerebelo, atravesando los árboles dendríticos de numerosas células de Purkinje. Dichas ramas transversales se denominan fibras paralelas y constituyen la estructura más característica del cerebelo.

#### **4.2.- Circuito neuronal de la corteza cerebelosa.**

La transmisión de la información en la corteza cerebelosa sigue un esquema básico, según el cual, las neuronas granulares reciben señales del exterior del cerebelo y, a su vez, estimulan a las células de Purkinje a través de múltiples sinapsis. Pero el resultado final viene determinado por otras células, que ejercen un control más fino de la transmisión de la información.



#### 4.2.1.- Vías eferentes y aferentes.

Las neuronas de Purkinje constituyen la única vía eferente del cerebelo que envía información a otras zonas del encéfalo. A través de sus largas prolongaciones, mandan señales al interior de cerebelo, desde donde transmiten a otras partes del cerebro, principalmente a la corteza cerebral.

Existen tres vías de entrada de información a la corteza cerebelosa (figura 21):

##### 1.- Fibras musgosas.

Las señales aferente procedentes del exterior son captadas por las neuronas granulares a través de las fibras musgosas, que están formadas por axones mielinizados procedentes de diferentes localizaciones extracerebelares como el tallo cerebral, la médula espinal y el encéfalo superior. En su ascenso envían colaterales a los núcleos profundos y llegan hasta la capa granular donde se ramifican y forman unas estructuras denominadas rosetas que quedan rodeadas por las terminaciones axónicas de las células de Golgi, con las que también establecen sinapsis en el soma, y las dendritas de las células granulares formando los glomérulos cerebelosos. Las neuronas granulares transmiten la información mediante las fibras paralelas. De cada célula emerge una prolongación eferente que llega a la capa externa de la corteza donde se bifurca en dos ramas que forman un ángulo recto respecto a la fibra de origen. Estas fibras cortan perpendicularmente a los árboles dendríticos de las neuronas de Purkinje, transmitiéndoles señales que incrementan su actividad. La activación de una neurona de Purkinje requiere la estimulación simultánea de un gran número de fibras musgosas, que desencadenan potenciales de acción sencillos y breves denominados espigas simples.

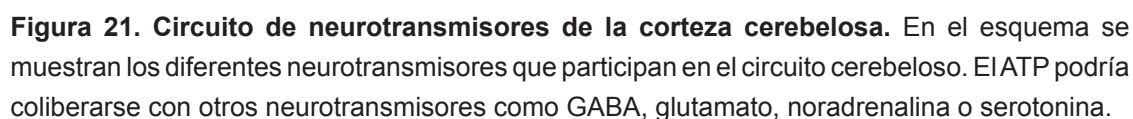
##### 2.- Fibras trepadoras.

Son axones mielinizados procedentes del núcleo de la oliva inferior, situado en la médula espinal. Ascenden por la capa molecular emitiendo colaterales hacia los núcleos profundos, y en menor medida a la capa granular. En la capa molecular cada fibra trepadora inerva a varias neuronas de Purkinje formando un plexo muy ramificado que se entrelaza con el árbol dendrítico de estas células con las que establece multitud de sinapsis. Una de las características de esta vía aferente es que un impulso enviado por una fibra trepadora genera en cada una de las neuronas de Purkinje con las que contacta un único potencial de acción complejo y de larga duración denominado espiga compleja.

Las fibras trepadoras, al igual que las musgosas y paralelas, emplean como neurotransmisor el glutamato, aunque se ha descrito que algunas fibras musgosas podrían emplear acetilcolina.

##### 3.- Fibras monoaminérgicas.

Por un lado, los axones procedentes del *locus coeruleus*, que acceden al cerebelo y forman un plexo difuso en las tres capas de la corteza cerebelosa, liberan noradrenalina. Estos axones establecen sinapsis, entre otros elementos, con el soma de las células de Purkinje. Por otro lado, hasta la capa granular y molecular llegan fibras serotoninérgicas que proceden de



En el cerebelo existen cuatro tipos de interneuronas inhibitorias que son las responsables de que la actividad en la corteza cerebelosa no sea excesiva. Las células estrelladas y las células en cesta reciben señales excitatorias de las fibras paralelas, ellas a su vez establecen contacto con las neuronas de Purkinje a través de las cuales inhiben su actividad. Las células estrelladas establecen sinapsis principalmente con el árbol dendrítico de las neuronas de Purkinje, mientras que las células en cesta rodean con sus axones el soma y el segmento axónico inicial de las neuronas de Purkinje.

El tercer tipo de interneurona inhibitoria son las células de Golgi, que están situadas en la capa granular, pero desarrollan un gran árbol dendrítico en la capa molecular donde establecen numerosos contactos excitatorios con las fibras paralelas. En la capa granular las terminaciones axónicas de estas interneuronas se extienden entre las neuronas granulares y les transmiten señales inhibitorias. Se piensa que esta interacción actúa como filtro de las señales procedentes de las fibras musgosas antes de que lleguen a las neuronas de Purkinje. Al igual que las células estrelladas y en cesta, las neuronas de Golgi son de naturaleza GABAérgica. Este neurotransmisor inhibe las corrientes mediadas por los receptores de NMDA presentes en las neuronas granulares y que son activados por el glutamato liberado



por las fibras musgosas (Armano y cols., 2000). A su vez este neurotransmisor excitatorio activa receptores mGluR2 presentes en las neuronas de Golgi provocando una disminución de la excitabilidad de estas neuronas (Watanabe y Nakanishi, 2003). Además, la activación de receptores metabotrópicos de glutamato presinápticos inhiben la liberación de GABA por las neuronas de Golgi (Mitchell y Silver, 2000).

Las neuronas de Lugaro constituyen el cuarto tipo de interneurona de la corteza cerebelosa. Estas células se localizan en la capa granular y reciben sinapsis procedentes de las fibras paralelas y de las colaterales axónicas de las neuronas de Purkinje. Sus axones se extienden horizontalmente antes de ascender hasta la capa molecular donde se ramifican mucho, estableciendo multitud de contactos sinápticos todavía no bien caracterizados.

#### **4.3.- Nuevas funciones del cerebelo.**

Durante mucho tiempo se consideró que la única función del cerebelo era ayudar a la corteza cerebral en el control y coordinación de los movimientos. Sin embargo, gracias a la aparición de técnicas que permiten la toma de imágenes cerebrales, se ha descubierto que el cerebelo humano se encuentra activo durante gran variedad de actividades que no guardan relación con el movimiento y que son controladas por diferentes regiones cerebelosas (Schmahmann, 2004; Allen y cols., 2005). Así, numerosos estudios han puesto de manifiesto que los estímulos táctiles inducen un incremento de la actividad en una extensa región del cerebelo mayor a la provocada cuando se lleva a cabo la tarea de coger y soltar un objeto (Heck y Sultan, 2002).

En relación con el control del movimiento ejercido por el cerebelo, pero a un nivel superior, se ha comprobado que este órgano participa en el aprendizaje de tareas motoras a través del mecanismo conocido como “depresión a largo plazo” (LTD). Según este modelo, cuando se produce la excitación simultánea de las fibras paralelas y trepadoras se produce una depresión a largo plazo de las sinapsis entre las fibras paralelas y las neuronas de Purkinje y se atenúa el envío de información a los núcleos profundos del cerebelo (Hansel y cols., 2001; Linden, 2003). Esta depresión de la sinapsis es debida a la internalización de las subunidades GluR2 de los receptores de AMPA (Ito, 2002).

Además, se ha comprobado que la lesión de determinadas áreas del cerebelo provocan alteraciones cognitivas y afectivas (Exner y cols., 2004), debido a la interrupción de los circuitos de comunicación con la corteza cerebral. Pacientes con alteraciones en el cerebelo presentan dificultades para distinguir sonidos similares, para realizar ciertas tareas verbales y son más propensos a cometer errores en pruebas de razonamiento espacial. Las alteraciones en la habilidad verbal parecen estar causadas por daños en el hemisferio derecho, mientras que alteraciones en la percepción espacial son causadas por daños en el hemisferio izquierdo (Hokkanen y cols., 2006).

El autismo y otras enfermedades similares pueden estar causadas por alteraciones cerebrales ocurridas durante las primeras etapas del desarrollo. Recientemente se ha

observado que en estos pacientes el cerebelo tiene un volumen mayor al habitual, lo que indica que existe una estructura anormal que sin duda afecta a los circuitos cerebelares-cerebrales que provocan la aparición de dificultades en el aprendizaje (Herbert y Caviness, 2006). Del mismo modo, en pacientes esquizofrénicos se han detectado alteraciones en la vermis.

En el caso de la ataxia espinocerebelar, las alteraciones en la coordinación van acompañadas de dificultades cognitivas. Éstas se deben probablemente a la ruptura de las vías aferentes y eferentes que existen entre el cortex prefrontal y estructuras subcorticales entre las que se encuentra el cerebelo (Alekseeva y cols., 2005). También pueden producirse retrasos en el aprendizaje en niños a los cuales se les ha extirpado un tumor de la fosa posterior (Grill y cols., 2004).

Por todo ello, el cerebelo es objeto de estudio en la investigación de determinadas enfermedades y en el campo de la neurociencia conductual.

#### **4.4.- El sistema purinérgico en cerebelo.**

Hay numerosas evidencias que sugieren que el sistema purinérgico desempeña un importante papel en la neurotransmisión en el cerebelo. En los primeros estudios sobre la distribución de receptores de nucleótidos en sistema nervioso, se observó que el cerebelo, en especial las neuronas de Purkinje, era la región con mayor densidad de sitios de unión a [ $^3\text{H}$ ]  $\alpha\beta$ -meATP (Bo y Burnstock, 1994; Balcar y cols., 1995). Además, se ha comprobado que las fibras noradrenérgicas procedentes del *locus coeruleus*, que establecen sinapsis con las neuronas de Purkinje, liberan ATP junto con dicha catecolamina (Nieber y cols., 1997).

Posteriormente, diversos grupos hemos demostrado la presencia de diferentes componentes del sistema purinérgico en distintos tipos de células cerebelosas. En neuronas granulares, el ATP incrementa la liberación de aspartato y glutamato y se han detectado diversas enzimas implicadas en el metabolismo de nucleótidos, como son la ecto-5'-nucleotidasa y la ecto-ATPasa (Merlo y Volonte, 1996; Zinchuk y cols., 1999). Nuestro grupo ha demostrado la existencia de sitios de unión de alta afinidad para el diadenosina tetrafosfato  $\text{Ap}_4\text{A}$  en la capa granular (Rodríguez-Pascual y cols., 1997), así como la presencia de diversos receptores P2X y P2Y funcionales en las células de Purkinje, en las neuronas granulares y en sinaptosomas de cerebelo (Mateo y cols., 1998; Hervas y cols., 2003; Sanchez-Nogueiro y cols., 2005; Hervas y cols., 2005; Ortega y cols., 2008). La expresión de subunidades P2X también ha sido descrita en otros tipos celulares de cerebelo, como son las células estrelladas y los astrocitos (Loesch y Burnstock, ; Soto y Rubio, 2001).

La expresión de los receptores purinérgicos en el cerebelo varía durante las distintas etapas del desarrollo (Xiang y Burnstock, 2005). En cultivos de neuronas de Purkinje neonatales, los incrementos de calcio inducidos por ATP están mediados por un receptor compuesto por subunidades  $\text{P2X}_2$ , probablemente por un heterómero  $\text{P2X}_2/\text{P2X}_6$  (García-Lecea y cols., 1999). Sin embargo, en la etapa adulta el responsable de estas respuestas es un

heterómero P2X<sub>4</sub>/P2X<sub>6</sub> (García-Lecea y cols., 2001).

Esta tesis doctoral es continuación de los trabajos realizados por el grupo durante años anteriores, en los cuales demostraron que los astrocitos de cerebelo de rata coexpresan diferentes receptores P2Y, los receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2/4</sub> y P2Y<sub>6</sub>, así como un receptor metabotrópico, todavía no identificado, específico para Ap<sub>5</sub>A (Jimenez y cols., 2000; Jimenez y cols., 2002). Todos estos receptores están acoplados a la fosfolipasa C y pueden interaccionar entre ellos y con otros sistemas. De este modo, el EGF, el Ap<sub>5</sub>A y la adenosina potencian las respuestas de calcio inducidas por ATP a través de diferentes mecanismos (Jimenez y cols., 1998; Jimenez y cols., 1999). En el caso del dinucleótido y del factor de crecimiento, la potenciación podría estar mediada por la cascada de las proteínas ERKs (Delicado y cols., 2005), mientras que el efecto de la adenosina podría deberse a la activación de la fosfolipasa C por las subunidades  $\beta\gamma$  liberadas de las proteínas G<sub>s</sub> a las que se acopla el receptor A<sub>2B</sub> expresado en los astrocitos.

Todos estos datos demuestran que el sistema purinérgico está presente en los diferentes tipos de células del cerebelo, incluidos los astrocitos, donde los nucleótidos son capaces de activar diversas cascadas de señalización. Por ello, decidimos profundizar en la caracterización de la señalización purinérgica en los astrocitos de cerebelo de rata, estudiando la presencia de nuevos receptores de nucleótidos, así como las cascadas intracelulares a las que están acoplados.



## Objetivos



Cuando se inició este trabajo de investigación estaba demostrado que en muchas de las acciones del ADP no estaba involucrado el receptor  $P2Y_1$ . En plaquetas y en células C6 glioma, se comprobó que la inhibición de la adenilato ciclasa inducida por ADP estaba mediada por un receptor diferente, identificado posteriormente como el receptor  $P2Y_{12}$ . A la clonación de este receptor le siguieron la de otros receptores metabotrópicos de nucleótidos pertenecientes a la misma subfamilia estructural, los receptores  $P2Y_{13}$  y  $P2Y_{14}$ . El receptor  $P2Y_{13}$ , al igual que el receptor  $P2Y_{12}$ , estaba acoplado a la inhibición de la adenilato ciclasa a través de proteínas  $G_{i/o}$ . El cerebelo, concretamente la materia blanca, era una de las zonas donde se había detectado la presencia de un receptor de ADP acoplado a una proteína  $G_i$ . Por otra parte, los astrocitos de cerebelo poseían todos los elementos de la cascada de señalización del sistema adenilato ciclasa, que podía ser activada por receptores  $\beta$ -adrenérgicos y receptores de adenosina tipo  $A_{2B}$ . Ésto nos llevó a cuestionarnos si alguno de los nuevos subtipos de receptores de nucleótidos se estarían expresando en los astrocitos de cerebelo (objetivos 1 y 2).

Durante el desarrollo de estos primeros objetivos, varios grupos pusieron de manifiesto la presencia del receptor ionotrópico  $P2X_7$  en diferentes preparaciones del sistema nervioso. Este receptor presentaba unas características particulares que lo diferenciaban del receptor  $P2X_7$  expresado en el sistema inmune o en las glándulas salivares. Teniendo en cuenta que este subtipo de receptor se activa únicamente a concentraciones elevadas de ATP, en el rango milimolar, y el papel neuroprotector de los astrocitos nos planteamos si se expresaba en nuestro modelo celular (objetivos 3-5).

Por todo ello, nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1.- Analizar si los astrocitos de cerebelo de rata expresan, junto con el receptor  $P2Y_1$ , algún subtipo de receptor  $P2Y$  específico de ADP acoplado a la inhibición de la adenilato ciclasa mediante proteínas  $G_{i/o}$ .
- 2.- Caracterizar las cascadas de señalización activadas por los receptores de ADP expresados en los astrocitos de cerebelo.
- 3.- Analizar la expresión y distribución de las diferentes subunidades de los receptores  $P2X$  en los astrocitos de cerebelo.
- 4.- Caracterizar funcionalmente de los receptores  $P2X$  detectados, centrándonos en el receptor  $P2X_7$ .
- 5.- Estudiar las cascadas de señalización activadas por el receptor  $P2X_7$  y sus posibles implicaciones fisiológicas.



# 3

## **Materiales y Métodos**





## **1.- MATERIALES.**

### **1.1.- Material biológico.**

Para los cultivos de astrocitos de cerebelo se utilizaron ratas Wistar de siete días, machos o hembras indistintamente, de la misma camada. Los cerebelos se obtuvieron mediante decapitación del animal y disección del cerebro. Inmediatamente se introdujeron en una solución salina estéril (Medio de aislamiento) y se inició el cultivo.

Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo a la normativa del International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS).

### **1.2.- Instrumentación.**

#### **a) General.**

En todas las etapas preparativas se utilizaron:

- Balanzas de precisión AND ER-60 y granatario AND de los modelos FX 2000 y EW 300.
- Agitadores magnéticos Agimatic-S de Selecta y Labinco y orbitales Luckham 802.
- pHmetro Crisson 2001.
- Pipetas automáticas Gilson y Eppendorf.

Los medios de cultivo, tampones y disoluciones se prepararon en agua desionizada de alta calidad y pureza obtenida con un equipo de filtración Milli-RO/Milli-Q Water Purification System de Millipore. En los casos en los que se requería conservación en frío se utilizaron frigoríficos de la casa Liebherr.

Para la conservación de muestras y compuestos se dispuso de congeladores a  $-20^{\circ}\text{C}$  de la casa Liebherr y a  $-80^{\circ}\text{C}$  de Forma Scientific.

Las centrifugaciones se llevaron a cabo en centrífugas de mesa Heraeus Biofuge pico y microfugas Eppendorf modelo 5415 D.

Las incubaciones que requirieron determinadas condiciones de temperatura se realizaron en baños Tectron Bio de Selecta, E10 de Lauda, TW2.03 de Elmi, agitadores termostatzados para placas de Elmi modelo ST-3 y termomezclador modelo Thermomixer compact de Eppendorf.

#### **b) Cultivos celulares.**

La obtención de astrocitos de cerebelo y la manipulación de los cultivos se realizó en condiciones de esterilidad bajo campanas de flujo laminar vertical Gelaire, modelos Twin 30 y TC 48 de Cultek. Los cultivos celulares se mantuvieron en un incubador Heraeus modelo B 5060 EK con flujo controlado de  $\text{CO}_2$  al 5% y temperatura constante de  $37^{\circ}\text{C}$ . La purificación de los cultivos primarios de astrocitos se llevó a cabo mediante agitación en un agitador orbital de Labotrom en condiciones controladas de temperatura.

En el sembrado y manejo de las células se emplearon:

- Pipetas de aspiración FastPette de Labonet.
- Pipetas estériles de plástico de 10 mL de Costar.
- Frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> de tapón ventilado con filtro de 0,2 µm de Falcon.

Falcon.

- Placas de cultivo de 35 y 100 mm, placas multipocillos de 24 y 6 pocillos suministradas por Costar y Falcon.
- Cubreobjetos de 15 mm y 12 mm de diámetro de Deckgläser.

Para contar las células se utilizó una cámara de Neubauer y un microscopio óptico Leitz HM-LUX 3. La observación de los cultivos se realizó en un microscopio de contraste de fase Wilovert (Will).

Para la obtención y lavado de las células se empleó una centrífuga de mesa refrigerada de baja velocidad Omnifuge modelo 2.0 RS de Heraeus.

La esterilización de los medios de cultivo se llevó a cabo por filtración usando membranas AcroCap de 0.2 µm de tamaño de poro (Gelman Sciences) con la ayuda de una bomba peristáltica Millipore o con filtros Millex-GS (Millipore) de 0.22 µm empleando una jeringuilla de 25 mL.

Los materiales de cultivo y disección se esterilizaron en un autoclave Autotester-G de Selecta.

#### **c) RT-PCR.**

El equipamiento utilizado en estos experimentos fue:

- Termociclador de Applied Biosystems modelo GeneAmp PCR System 2400.
- Cubetas de electroforesis submarina modelo Hoefer HE 33 con su correspondiente fuente de alimentación de Amersham Pharmacia.
- La visualización de los geles se realizó en un transiluminador UV de Spectroline.
- La adquisición de imágenes se llevó a cabo con el sistema Fluor-S Multimager de Bio-Rad.

**d) Las determinaciones radiométricas** se realizaron en un contador de centelleo líquido Beckman modelo LS 3801.

#### **e) Determinaciones fluorimétricas.**

Los equipos empleados fueron:

- Para las medidas de calcio libre citosólico en poblaciones celulares, un fluorímetro Perkin Elmer LS 55 controlado por un ordenador Nech Pentium II y termostatzado con un baño Braun modelo Frigomix U.
- En las determinaciones de calcio citosólico en células individuales se utilizó un microscopio de epifluorescencia NIKON TE-200 acoplado a una cámara ORCA-ER C 47 42-80 de Hamamatsu. Las células se visualizaron con un objetivo Nikon Plan

Fluor 20X/0.5. Las células se excitaron con luz a 340 nm y a 380 nm seleccionadas con una rueda de filtros Lambda 10-2 de Sutter Instrument Co. Todo el equipo está controlado por el software Metafluor 6.2r & PC software (Universal Imaging Corp, Cambridge, UK).

#### f) Inmunocitoquímica.

Para la observación de las preparaciones inmunocitoquímicas se utilizó un microscopio de fluorescencia NIKON TE-200 equipado con una lámpara de Xenon de 75 W de Nikon y acoplado a una cámara Kappa modelo DX2. La visualización de las células se realizó con un objetivo de inmersión de aceite 60X1.4. Todo el sistema se controla a través del software Kappa Image Base Control. Las imágenes se procesaron posteriormente con los programas Lucida 3.0 (Kinetic imaging) y Paint Shop Pro 8.0 (Jasc Software).

#### g) Experimentos de inmunotransferencia (Western Blot).

Los equipos utilizados fueron:

- El sistema Mini-Protean 3 de Bio-Rad para la electroforesis.
- La transferencia se llevó a cabo en los sistemas Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell o Semi-Dry Electroforetic Transfer Cell de Bio-Rad.
- El revelado de las membranas, así como la cuantificación de las bandas se realizó en el sistema Fluo-S Imager de Bio-Rad.

### 1.3.- Reactivos.

Categoría y uso	Reactivo	Casa comercial
<b>Cultivos de astrocitos</b>		
Aislamiento	BSA	Roche
Antibióticos	Tripsina, Inhibidor de tripsina y DNasa I	Sigma
Mantenimiento	Penicilina/Estreptomicina, Kanamicina y Anfotericina	Cultek
	DMEM, Suero bovino fetal y Tripsina-EDTA	Invitrogen
<b>Experimentos de PCR</b>		
Extracción de RNA	RNeasy Mini Kit	Qiagen
Geles	Kit DNA free	Ambion
	Agarosa D5	Pronadisa
RT-PCR	SYBR-Gold	Molecular Probes.
	TaqMan <sup>®</sup> RT reagents y TaqGold DNA polimerasa	Applied Biosystems
Inhibidores de RNasa	DEPC y Rnase-Zap	Sigma
<b>Determinación de AMPc</b>		
	Cyclic AMP ( <sup>3</sup> H) assay system	Amersham
	cAMP ( <sup>125</sup> I) biotrak assay system	

**Tabla 5.- Reactivos utilizados. Primera parte.**

Categoría y uso	Reactivo	Casa comercial
<b>Fluorimetría</b> Sonda fluorescente de calcio	Fura-2 AM	Molecular Probes
<b>Farmacología</b> Agonistas y antagonistas purinérgicos.  Toxinas, inhibidores de proteínas de señalización	ATP, ADP, UTP, 2MeSADP, y BzATP, PPADS, MRS-2179, 2MeSAMP y BBG PTX, PP2, PDBu, Gö 6850, U-73122 y U-0126	Sigma/Tocris  Calbiochem
<b>Inmunocitoquímica</b> Fijación y bloqueo  Anticuerpos primarios  Anticuerpos secundarios  Montaje	p-formaldehído, suero de cabra, suero de burro, Tritón X-100 y BSA Anticuerpos frente a P2Y y P2X (conejo) Anti-GFAP (conejo) Anti-IgG de ratón-FICT (cabra) y anti-IgG de conejo-TRICT (cabra) Anti IgG de ratón-FICT (burro) y anti-IgG de conejo-Cy <sup>TM</sup> 3 (burro) Medio Prolong antifade	Sigma  Alomone/Chemicon  Sigma  Sigma Jackson Inmuno Research Molecular probes
<b>Inmunotransferencia</b> Electroforesis y transferencia    Bloqueo y lavados. Anticuerpos primarios   Anticuerpos secundarios  Revelado	Persulfato amónico, bis-acrilamida, SDS, Temed, Glicina, patrones de peso molecular conocido y β-mercaptoetanol Tris y azul de bromofenol. Metanol Membranas de PVDF BSA y Tween-20 Anti-p-ERK (E-4) y anti-ERK2 (D-2) (ratón) Anti-PKCμ (D-20) (conejo) Anti p-PKD (Ser 744/748) (conejo) Anti-GADPH (ratón) Anti-IgG de ratón-HRP (cabra) Anti-IgG de conejo-HRP (burro) Reactivo ECL	Bio-Rad    Merck Carlo-Erba Amersham Sigma Santa Cruz Biotech Santa cruz Biotech Cell signalling Ambion Santa cruz Biotech Amersham Pierce

**Tabla 5.- Reactivos utilizados.** Segunda parte

En general, cualquier otro compuesto no especificado en la tabla 5 fue suministrado por Merck o por Sigma.

El anticuerpo que reconoce a la PKD fosforilada en el residuo Ser<sup>916</sup> y el utilizado para la detección de Kidins220 proceden del laboratorio de la Dra. Teresa Iglesias del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols de Madrid. Todos son anticuerpos policlonales obtenidos de conejo.

## 2.- MÉTODOS.

### 2.1.- Aislamiento y cultivo de astrocitos cerebelosos tipo I.

#### 2.1.1.- Obtención de células de cerebelo.

Las células de cerebelo se obtuvieron a partir de ratas Wistar de 7-8 días de edad según el método descrito por Dutton y cols. (1981)

Tabla 6.- Medio de aislamiento	
NaCl	130 mM
KCl	4 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM
Hepes	10 mM
Glucosa	15 mM
MgSO <sub>4</sub>	1,5 mM
BSA	50 µM
Penicilina	50 U/ml
Estreptomicina	50 µg/ml
pH	7.4

Grupos de 6 ratas de la misma camada se sacrificaron por decapitación. Los cerebelos, una vez localizados, se extrajeron con unas pinzas de microdisección estériles e inmediatamente se sumergieron en **medio de aislamiento** atemperado a 37°C y se trasladaron a una campana de flujo laminar.

Después de eliminar los capilares, restos de las meninges y de materia blanca, los cerebelos se disgregaron con unas tijeras de microdisección y se dispersaron cuidadosamente en 10 mL de **medio de tripsinización** (medio de aislamiento suplementado con 0,25 mg/mL de tripsina) con ayuda de una pipeta pasteur estéril. Se dejó actuar la tripsina durante 10 minutos a 37°C, realizando cuatro pases por la pipeta

Pasteur cada 5 minutos de incubación. Una vez transcurridos los 10 minutos se adicionó la **solución de parada** (0,25 mg/mL de inhibidor de tripsina de haba y 10 UI/mL de DNasa I en medio de aislamiento) y se centrifugó a 65 x g durante 1 minuto en una centrífuga de mesa de baja velocidad. El sobrenadante se retiró cuidadosamente y se volvió a centrifugar. Cada uno de los sedimentos obtenidos se resuspendió en 1 mL de **medio de trituración** (1,5 mM MgSO<sub>4</sub> (3 mM final), 0,25 mg/mL de inhibidor de tripsina y 250 UI/mL de DNasa I en medio de aislamiento), se aunaron y finalmente la suspensión celular se disgregó haciéndola pasar 10 veces a través de tres pipetas Pasteur de vidrio con el diámetro de la punta cada vez más pequeño. Posteriormente se adicionó medio de aislamiento y se centrifugó a 150 x g durante 10 minutos a 20°C. El sedimento se resuspendió en **DMEM** y se procedió a contar el número de células.

#### 2.1.2 Determinación del número de células y de la integridad celular.

El conteo se realizó en un hemocitómetro de Neubauer. Para ello, se llevó a cabo una dilución 1:10 de la suspensión celular en DMEM (20µl de células en 200 µl). Una alícuota de esta dilución se mezcló con otra igual de Azul Tripán (1:1 v/v) y se colocó en la cámara

de Neubauer para su conteje en un microscopio óptico. Las células viables son aquellas en las que no se produce entrada de colorante, contándose por tanto sólo las células no azules. El Azul Tripán se preparó al 0,5% en NaCl 138 mM y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  48,5 mM (isoosmótico), se hirvió y cuando se enfrió se ajustó el pH a 7,2-7,3 con NaOH 1N. Normalmente la viabilidad de las células superó el 95%.

La estimación del número de células/mL se realizó mediante la siguiente igualdad:

$$\text{N}^\circ \text{ de células} = \text{n}^\circ \text{ de células contadas} \times 10^4 \times \text{dilución}$$

Compuesto	mg/L	Compuesto	mg/L
<b>Aminoácidos</b>		<b>Vitaminas</b>	
L-Arginina.HCl	84	Cloruro de colina	4
L-Cisteina.2HCl	63	Ácido fólico	4
L-Fenilalanina	66	i-inositol	7,2
Glicina	30	Niacinamida	4
L-Glutamina	584	D-calcio-Pantotenato	4
L-Histidina.HCl.H <sub>2</sub> O	42	Piridoxal.HCl	4
L-Isoleucina	105	Riboflavina	0,4
L-Leucina	105	Tiamina.HCl	4
L-Lisina.HCl	146	<b>Sales inorgánicas</b>	
L-Metionina	30	NaCl	6400
L-Serina	42	KCl	400
L-Treonina	95	CaCl <sub>2</sub>	200
L-Triptófano	16	MgSO <sub>4</sub>	97,67
L-Tirosinadisodio.2H <sub>2</sub> O	104,18	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	125
L-Valina	94	Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	0,1
		NaHCO <sub>3</sub>	3700
<b>Compuesto</b>		<b>mg/L</b>	
<b>Otros componentes</b>			
D-glucosa		1000	
Piruvato sódico		110	
Rojo de Fenol		15	

**Tabla 7.- Composición del medio de cultivo DMEM** (medio de Eagle modificado por Dubelco).

### 2.1.3.- Cultivo primario enriquecido en astrocitos cerebelosos tipo 1.

Después del conteje las células se resuspendieron en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, 30 mM de glucosa, 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 100 µg/mL de kanamicina y 2,5 µg/mL de anfotericina y se sembraron en botellas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> de tapón ventilado a una densidad de 6x10<sup>6</sup>

células/botella ( $8 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>). El cultivo se mantuvo en un incubador con atmósfera controlada de CO<sub>2</sub> al 5%, saturada de humedad y a temperatura constante de 37°C durante 10-12 días, reemplazando el medio cada 2-3 días.

En estas condiciones las neuronas cerebelosas no sobreviven y sólo lo hacen los astrocitos y otras células gliales que se dividen hasta alcanzar la confluencia, momento en el que dejan de dividirse, enriqueciéndose el cultivo en este tipo celular. Para purificar los astrocitos tipo 1 adheridos a las botellas de cultivo, se sometieron a agitación orbital a 250 rpm durante 18 horas a 37°C según el método descrito por McCarthy y de Vellis (1980). Finalizado el periodo de agitación se retiró el medio de cultivo que contenía las células no viables, microglía y astrocitos tipo 2, quedando adheridos a la superficie de cultivo únicamente los astrocitos tipo 1. Las células se utilizaron durante los siguientes cinco días.

#### 2.1.4.- Pasaje de astrocitos cerebelosos.

Tabla 8.- Locke de lavado	
NaCl	154 mM
KCl	5,6 mM
NaHCO <sub>3</sub>	3,6 mM
Glucosa	5,6 mM
HEPES	5,0 mM
Penicilina	50 UI/mL
Estreptomicina	50 µg/mL
pH	7,4

El pasaje de las células se realizó mediante tratamiento con tripsina. En primer lugar se retiró el medio de las botellas de cultivo, se lavaron con 10 mL de **Locke de lavado** dos veces. A continuación se añadieron 3 mL de una solución de tripsina-EDTA (Sigma) diluida 2:1 en Locke de lavado y se dejó actuar a 37°C durante 2 minutos, transcurridos los cuales se observaron las células al microscopio, si los astrocitos habían comenzado a redondearse y a desligarse de la botella se daban unos golpes enérgicos para favorecer la separación total de las células. La acción de la tripsina se detuvo mediante la adición de 5 mL de suero fetal

bovino. En el caso de que las células no hubieran comenzado a levantarse de la botella se llevaban de nuevo al incubador, se esperaba 1 minuto más y se repetía el proceso. La tripsina no debe dejarse actuar más de 5 minutos ya que puede producirse una proteólisis excesiva que provoque daño y muerte celular.

Después las células se recogieron en un tubo cónico, se lavaron las botellas con 10 mL de Locke de lavado y se centrifugaron a 150 x g durante 10 minutos a 20°C. El sobrenadante se eliminó y el sedimento se resuspendió en medio de cultivo, se llevó a cabo el conteo de las células y se sembraron a diferentes densidades y en distintos soportes, placas de 10 cm, placas multipocillo, cubreobjetos... según el experimento que se fuera a realizar.



## **2.2 Análisis de RNAm en astrocitos tipo 1 de cerebello.**

### **2.2.1.- Extracción de RNA.**

Los extractos de RNA total se obtuvieron a partir de astrocitos sembrados en placas petri de 10 cm de diámetro a una densidad de  $4 \times 10^6$  células/placa. Dos días más tarde, cuando las células habían alcanzado la confluencia, se procedió a la extracción del RNA total mediante el protocolo descrito en el kit RNeasy Kit de Quiagen, basado en la capacidad de unión del RNA a una columna de gel de sílice en presencia de una elevada concentración de sales. Las células se levantaron con raspadores celulares estériles y se emplearon 600  $\mu$ L de tampón desnaturizante (contiene isocianato de guanidina y  $\beta$ -mercaptoetanol, 10  $\mu$ L/mL) para obtener el lisado celular. Posteriormente, para lograr una mejor homogeneización y disminuir la viscosidad del lisado, éste se pasó varias veces a través de agujas estériles de tamaño 20-G (0,9 mm de diámetro). A continuación, se añadió un volumen igual de etanol, para conseguir las condiciones óptimas de unión, y las muestras se centrifugaron a  $\geq 8000 \times g$  en columnas que contenían una membrana de sílica gel a la que las moléculas de RNA mayores de 200 nucleótidos se unen por adsorción. Por tanto los RNA 5,8S, 5S y de transferencia quedaron en el eluido.

Después de cada extracción y de forma rutinaria las muestras de RNA se trataron con DNasa, de acuerdo con el Kit DNA-free (Ambion), durante 30 minutos a 37°C, para eliminar la contaminación del RNA con DNA genómico. A continuación se añadió el reactivo de inactivación de DNasa y se centrifugó a  $10.000 \times g$  recogiendo el sobrenadante que contiene el RNA.

### **2.2.2.- Cuantificación de RNA.**

La cuantificación del RNA se realizó mediante el método fluorimétrico de gran sensibilidad, que emplea el reactivo RiboGreen™ (RNA Quantitation Reagent, Molecular Probes). El RiboGreen unido al RNA tiene el máximo de excitación en torno a los 500 nm y el de emisión aproximadamente a 525 nm y permite una cuantificación de hasta 1ng/mL de RNA.

### **2.2.3.- Experimentos de RT-PCR.**

El cDNA se sintetizó a partir de 0,5-1  $\mu$ g de RNA total usando la transcriptasa inversa MultiScribe (Applied Biosystem). En un volumen final de 25  $\mu$ L por tubo se añadieron al tampón de reacción: 1,25 U/mL de transcriptasa inversa, 2,5  $\mu$ M oligo(dT)<sub>16</sub>, 0,5 U/  $\mu$ L de inhibidor de RNasa, 5,5 mM MgCl<sub>2</sub>, la mezcla de dATP/dCTP/dGTP/dUTP (0,5 mM cada uno). Después de 10 minutos de incubación a 37°C con los cebadores de oligodT, la reacción de transcripción inversa (RT) se realizó durante 30 minutos a 48°C seguido de 5 minutos a 95°C para inactivar la enzima.

Para cada muestra de RNA se llevó a cabo, de forma paralela, una reacción de RT en

ausencia de la enzima transcriptasa inversa para evaluar el grado de la contaminación por DNA genómico.

Del producto de cada reacción de RT se emplearon 2-5 µl para las reacciones de PCR. En éstas, se utilizaron la polimerasa Ampli Taq Gold (Applied Biosystems) y oligonucleótidos específicos de cada uno de los receptores de nucleótidos a evaluar (tabla 9). Para cada reacción de PCR, se llevó en paralelo un control sin cDNA molde y un segundo control con el producto obtenido en las reacciones de RT en ausencia del enzima. Como controles positivos de la expresión de los receptores P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> y P2Y<sub>14</sub> se utilizaron productos de RT obtenidos de plaquetas, bazo e hipocampo, respectivamente. En el caso de las subunidades P2X, como control positivo se empleó RNA obtenido de cerebelo completo. Las condiciones de amplificación fueron 40X (40s a 95°C, 30s a 60°C y 45 s a 72°C).

	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	pb
P2Y <sub>1</sub>	CATTCTTTATTTCTTGGCTGGAGAT	GAGTCATTTCTTCACTCTTGGATTGTA	100
P2Y <sub>12</sub>	CAGGTTCTCTTCCCATTGCT	CAGCAATGATGATGAAAACC	674
P2Y <sub>13</sub>	TACCTCAAGAACACTCTGGTGGCAGAC	TTCACGGATGATGGCGTTGCCTCCTTGTT	321
P2Y <sub>14</sub>	TGTCTGCCGTGATCTTCT	GGGTCCAGACACACATTG	589
P2X <sub>1</sub>	TTCCTCTATCACAAGATTCAAACAC	GCAAAiCTGAAGTTGTaiCCTGG	229
P2X <sub>2</sub>	TTCACATTTGATCAGGACTCTGAC	GCAAAiCTGAAGTTGTaiCCTGA	250
P2X <sub>3</sub>	TTGAGGGTAGGGGATGTGGT	GCTGATAATGGTGGGGATGA	326
P2X <sub>4</sub>	TTCATTTACAATGCTCAAACGGAT	GCAAAiCTGAAGTTGTaiCCAGG	250
P2X <sub>5</sub>	TTCCACTTCAGCTCCACAAATCTC	GCAAAiCTGAAGTTGTaiCCAGA	232
P2X <sub>6</sub>	CTGTGGGATGTGGCTGACTT	TCAAAGTCCCCTCCAGTCAT	484
P2X <sub>7</sub>	TTCACCTTTCACAAGACTTGGAAC	GCAAAiCTGAAGTTGTaiCCAGG	232

**Tabla 9.- Secuencia de las parejas de oligonucleótidos cebadores empleados en la amplificación de los receptores P2Y y de las subunidades P2X.**

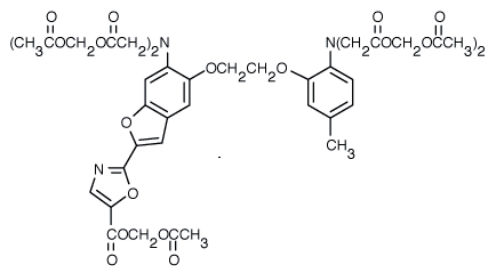
Tabla 10.- Tampón TAE.	
Tris-acetato	0,04 M
EDTA	0,001 M
pH	8,3

La visualización e identificación de los productos de PCR se determinó mediante electroforesis en geles de agarosa (1-2%) en tampón TAE (Tris-EDTA). Las bandas se visualizaron tras la tinción de los geles con SYBR Gold en un transiluminador.

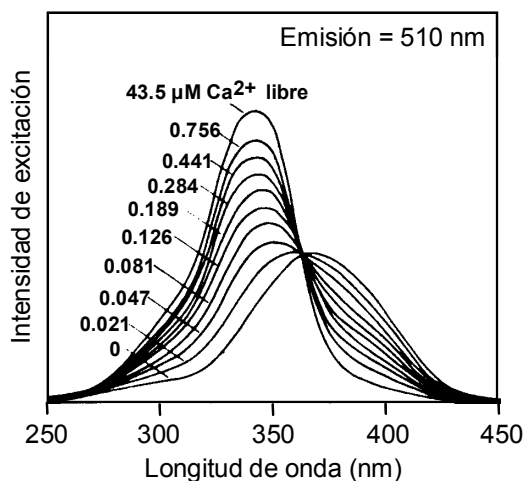
### 2.3.- Determinaciones fluorimétricas de calcio.

Estas medidas se realizaron empleando la técnica descrita por Grynkiewicz y cols. (1985), basada en el uso de la sonda fluorescente Fura-2, dicho indicador es un compuesto polianiónico hidrofílico que une específicamente  $\text{Ca}^{2+}$ . En los ensayos se utilizó la forma acetoximetil éster Fura-2 AM, que puede atravesar la membrana plasmática debido a su naturaleza hidrofóbica. Una vez en el citosol el enlace éster es hidrolizado por esterasas inespecíficas de modo que el Fura-2 ácido se libera y queda confinado en el citosol. La forma ácida de la sonda es la que tiene capacidad para unirse a calcio, la formación de este complejo da lugar a la emisión de fluorescencia con el máximo registrado a 510 nm al tiempo que se produce el desplazamiento del espectro de excitación de 380 nm a 340 nm (figura 22).

A.-



B.-



**Figura 22.- A.- Estructura de la sonda fluorescente Fura-2. B.- Espectros de excitación de la sonda para  $\text{Ca}^{2+}$  Fura-2.** La longitud de onda de excitación máxima se desplaza hacia el UV al unirse a  $\text{Ca}^{2+}$ . En una longitud de onda intermedia las formas Fura-2 y Fura-2/ $\text{Ca}^{2+}$  contribuyen igual y no existe cambio de fluorescencia al variar  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (punto isobéptico).

#### 2.3.1.- Determinación microfluorimétrica de la concentración de calcio libre intracelular, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , en astrocitos individuales.

Los astrocitos se sembraron el día anterior en cubreobjetos redondos de vidrio de 15 mm de diámetro a una densidad de 30.000 células/cm<sup>2</sup>. Para lograr la entrada de la sonda fluorescente en las células, éstas se incubaron con 5-7  $\mu\text{M}$  de Fura-2 /AM, durante 45 minutos a 37°C, en la solución salina **Locke normal** suplementado con 1mg/mL de albúmina de suero bovino (BSA). Transcurrido ese tiempo el cargado de las células se paró al sacar los cubreobjetos de la solución con Fura-2 e introducirlos en Locke normal con BSA.

Para realizar el ensayo los cubreobjetos se sellaron con grasa de vacío (hidrófoba) en

**Tabla 11.- Locke normal**

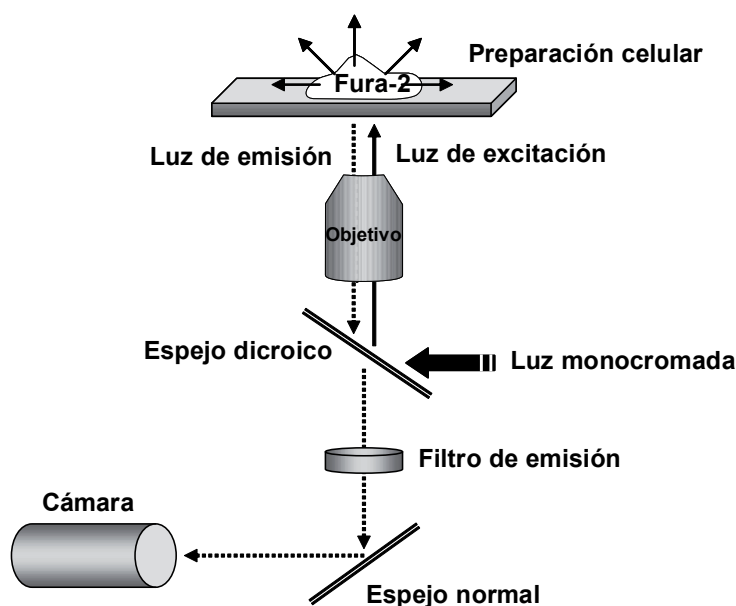
NaCl	140 mM
KCl	4,7 mM
CaCl <sub>2</sub>	2,5 mM
MgSO <sub>4</sub>	1,2 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM
Glucosa	5,5 mM
HEPES	10 mM
pH	7,4

la parte inferior de una cámara de perfusión de metacrilato de un volumen de 34  $\mu$ l. La cámara se colocó en la platina de un microscopio de epifluorescencia y se conectó mediante tubos de silicona a la entrada y salida de las soluciones de perfusión. Estas soluciones se mantuvieron a 37°C en un baño termostatzado situado a la altura suficiente para que el flujo se mantuviera constante a 1,5 mL/min por simple diferencia de presión hidrostática. La cámara se cerró sellando en su parte superior otro cubreobjeto. Mediante una bomba de vacío se aspiró de manera continua el medio

de perfusión después de su llegada a la cámara para evitar la acumulación de los productos de hidrólisis de los compuestos perfundidos o que pudieran salir de las células. El paso a la cámara de Locke normal o de los distintos compuestos disueltos en dicha solución con los que se perfundieron los astrocitos se reguló mediante un sistema de válvulas que funcionaba por gravedad. En los ensayos con antagonistas, las células se perfundieron con estos compuestos durante los tres minutos previos a la coestimulación con el agonista.

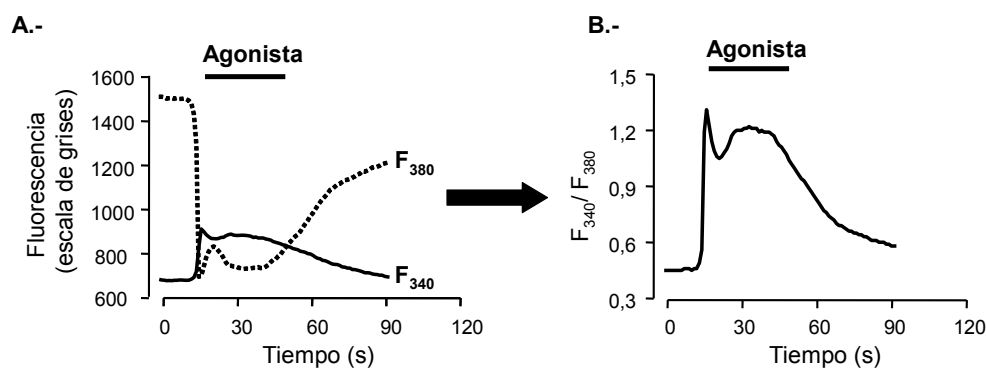
Una vez montada la cámara en el microscopio las células se iluminaron alternativamente a 340 nm y a 380 nm, seleccionadas mediante un monocromador de ancho de banda de 12 nm. La selección de las longitudes de onda se corresponde con los máximos de los registros de fluorescencia de las soluciones de Fura-2 saturadas de calcio (340 nm) y Fura-2 libre de calcio (380 nm).

El haz de luz monocromada se condujo hacia el microscopio con una guía líquida. La luz es reflejada hacia el objetivo mediante un espejo dicróico que transmite las longitudes de onda superiores a 430 nm y refleja las longitudes de onda inferiores. De este modo, sólo alcanzan la muestra la luz de 340 y 380 nm, mientras que la luz fluorescente emitida por el Fura-2, de 510 nm, atraviesa el espejo dicróico y es conducida hacia la cámara ORCA-ER C 47 42-80 de Hamamatsu después de pasar por un filtro interferencial de paso de banda centrado a 510 nm. Para hacer las medidas de fluorescencia se usó un objetivo Nikon 20X de apertura numérica de 0,5 (figura 23). El tiempo de exposición fue de 150 ms y el tiempo necesario para que se produzca el cambio de longitud de onda de la luz que incide sobre la muestra era inferior a los 5 ms. La toma de imágenes se realizó, para ambas longitudes de onda de excitación, cada 1,5 s cuando las estimulaciones realizadas eran de 30 s. En aquellos ensayos donde los compuestos se perfundían más tiempo, los ciclos de captura de imágenes se producían cada 2,5 s. Estas imágenes y sus valores asociados se almacenaron en un ordenador conectado en línea y posteriormente se analizaron matemáticamente.



**Figura 23.- Representación esquemática del sistema de microfluorimetría.** La iluminación proviene de un monocromador que emite luz a 340 o 380 nm. El haz de luz monocromada se dirige al microscopio a través de una guía líquida, se refleja en un espejo dicróico centrado a 430 nm y alcanza las células a través del objetivo del microscopio. La luz emitida por el Fura-2 confinado en el interior celular es capturada por el objetivo. Atraviesa el espejo dicróico (>430 nm) y se dirige entonces hasta el filtro de emisión centrado en 510 nm. Por último, el haz de luz llega a la cámara.

Los registros de fluorescencia que se muestran en este trabajo representan la relación existente entre los valores de fluorescencia a 340 nm y 380 nm ( $F_{340}/F_{380}$ ) en función del tiempo, obtenidos a partir de regiones elípticas colocadas sobre las células individuales en función del tiempo (figura 24).



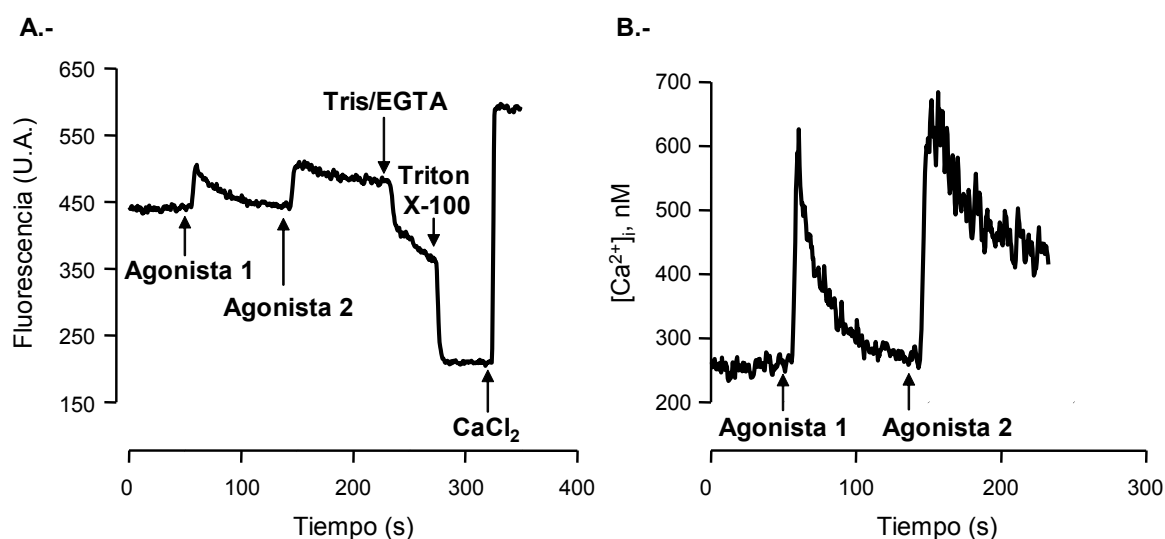
**Figura 24.- Cálculo de la relación de fluorescencia a cada tiempo medidas a 340 y 380 nm.**

**A.-** Intensidad de fluorescencia a las dos longitudes de onda de excitación registradas. **B.-** Los registros temporales obtenidos se dividen entre sí para obtener la ratio de fluorescencia  $F_{340}/F_{380}$ .

### 2.3.2.- Determinación fluorimétrica de $[Ca^{2+}]_i$ en poblaciones celulares.

Para realizar estos ensayos se emplearon astrocitos en suspensión obtenidos tras la tripsinización de las botellas en cultivo. Las células se centrifugaron a  $150 \times g$  durante 10 minutos y se resuspendieron en medio Locke normal. A continuación se incubaron, durante 45 minutos a  $37^\circ C$ , con la sonda fluorescente Fura-2/AM a una concentración  $5 \mu M$  en Locke normal suplementado con  $1 mg/mL$  BSA. Transcurrido ese tiempo las células se lavaron dos veces con Locke normal y se resuspendieron a una densidad de  $10^6$  células/mL. Posteriormente alícuotas de  $0,750$  mL de dicha suspensión celular se centrifugaron 1 minuto a  $15.000 \times g$ , se resuspendieron en  $1,5$  mL y se colocaron en cubetas termostatzadas a  $37^\circ C$  con agitación continua en un fluorímetro Perkin Elmer, donde se realizaron las medidas de fluorescencia. La intensidad de fluorescencia se determinó usando una longitud de onda de excitación de  $340$  nm y una longitud de onda de emisión de  $510$  nm. Las rendijas se fijaron en  $2,5$  nm para la excitación y entre  $5$  y  $7,5$  nm la de emisión, dependiendo de la eficacia de cargado de la sonda.

Los registros de fluorescencia se calibraron individualmente mediante el cálculo de los valores  $F_{min}$  y  $F_{max}$ . El primer parámetro se corresponde con la fluorescencia de la sonda medida en presencia de una mezcla de  $7,5$  mM EGTA/ $45$  mM Tris ( $[Ca^{2+}] < 0,2$  nM) y después de la ruptura de las células con  $0,3$  % de Triton X-100. El valor  $F_{max}$  corresponde a la fluorescencia registrada cuando, después de la liberación de la sonda por acción del detergente, se adiciona  $2,5$  mM de  $Ca^{2+}$  (figura 25). La toma de datos se realizó cada  $0,5$  s y se exportaron a un ordenador acoplado en línea, donde se procedió al análisis matemático de los registros de fluorescencia.



**Figura 25.- Registro fluorimétrico típico de Fura-2.** Los valores de fluorescencia en unidades arbitrarias (A) pueden ser transformados en valores de  $[Ca^{2+}]_i$  mediante la ecuación de Grynkiewicz (B).

La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre citosólico ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) se calculó a través de la ecuación descrita por Grynkiewicz y cols (1985):

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \frac{F - F_{\min}}{F_{\max} - F}$$

Donde  $F$  es la fluorescencia registrada a cada tiempo,  $F_{\min}$  es la fluorescencia mínima medida en ausencia de calcio ( $[\text{Ca}^{2+}] < 0,2 \text{ nM}$ ) y  $F_{\max}$  es la determinada en presencia de  $2,5 \text{ mM}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ . El valor de  $K_d$  empleado para el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ /Fura-2 fue de  $224 \text{ nM}$ . Los diferentes compuestos empleados en los ensayos se adicionaron a la cubeta de medida a partir de soluciones madre 100 veces concentradas para evitar variaciones considerables del volumen de incubación.

## 2.4.- Experimentos de inmunocitoquímica.

En estos ensayos se llevó a cabo la detección de determinadas proteínas mediante su unión a anticuerpos específicos, que después eran revelados con anticuerpos secundarios unidos a sondas fluorescentes.

Tabla 12.- PBS	
NaCl	137 mM
KCl	2,6 mM
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,5 mM
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	8,1 mM
pH	7,4

Los astrocitos se sembraron, el día anterior, en cubreobjetos redondos tal y como se ha descrito previamente para los experimentos de microfluorimetría. Después de lavarlos dos veces con **PBS** durante 5 minutos, se fijaron con p-formaldehído al 4% en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se realizó un lavado de 5 minutos con PBS y se trataron con la solución de bloqueo durante 1 hora a  $37^\circ\text{C}$ , para eliminar una posible unión

inespecífica del anticuerpo. La solución de bloqueo estaba compuesta por BSA al 3%, Triton X-100 al 0,1% y suero de cabra o de burro al 5% dependiendo de la especie animal en la que se habían obtenido los anticuerpos secundarios. Posteriormente, los cubreobjetos se lavaron dos veces con PBS/BSA, para eliminar la solución de bloqueo, y se incubaron 1 hora a  $37^\circ\text{C}$  con los anticuerpos primarios diluidos en PBS/BSA. Finalizada la incubación las células se lavaron tres veces con PBS/BSA durante 5 minutos a temperatura ambiente. Para revelar el marcaje las preparaciones se incubaron con los anticuerpos secundarios marcados con fluorocromos (FITC, TRICT o Cy-3) durante una hora a  $37^\circ\text{C}$ . Transcurrido ese tiempo, se realizaron tres lavados con PBS durante 5 minutos. Para terminar, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con el medio de montaje Prolong Antifade (Molecular Probes) que reduce el apagamiento de la fluorescencia de los fluorocromos. Una vez seco el medio de

montaje, las preparaciones se guardaron en oscuridad a 4°C hasta el momento de tomar las imágenes de fluorescencia con una cámara Kappa DX2.

La información sobre los anticuerpos utilizados y las diluciones empleadas aparece resumida en la tabla 13.

Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
P2Y <sub>1</sub>	1/100	TRICT	1/500
P2Y <sub>2</sub>	1/100	TRICT	1/500
P2Y <sub>12</sub>	1/50	TRICT	1/500
P2X <sub>1</sub>	1/100	Cy3	1/400
P2X <sub>3</sub>	1/100	Cy3	1/400
P2X <sub>4</sub>	1/100	Cy3	1/400
P2X <sub>7</sub>	1/100	Cy3	1/400
Kidins	1/200	Cy3	1/400
GFAP	1/200	FICT	1/500

**Tabla 13.- Diluciones de los anticuerpos utilizados en los ensayos de inmunofluorescencia.**

### **2.5.- Determinación de los niveles intracelulares de AMP cíclico.**

Para llevar a cabo estos ensayos las células se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad desde  $1,5 \times 10^5$  a  $2 \times 10^5$  células/pocillo, su procesamiento se realizó una vez alcanzada la confluencia. En el caso de los astrocitos, antes de iniciar el experimento cada pocillo se lavó con 1 mL de Locke normal durante 2 horas. Las células se preincubaron 30 minutos a 37°C con rolipram 500  $\mu$ M o IBMX 100  $\mu$ M, ambos compuestos son inhibidores de la fosfodiesterasa de AMPc. Seguidamente, se llevaron a cabo los distintos tratamientos con los antagonistas y agonistas indicados durante los tiempos señalados. Dichos tratamientos se pararon retirando el medio de incubación y adicionando ácido tricloroacético al 6% o añadiendo directamente ácido perclórico 6,6 N para producir la lisis celular. Los lisados recogidos se centrifugaron a  $16000 \times g$  durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente los extractos recogidos se neutralizaron con una mezcla KOH/TEA o freón/trioctilamina.

Los niveles de AMPc se determinaron mediante radioinmunoensayo, utilizando los kits suministrados por Amersham, basado en la competición entre el AMPc no marcado, procedente de las muestras, y el [<sup>3</sup>H]AMPc o [<sup>125</sup>I]AMPc que se añade, por unirse a una proteína específica purificada que presenta una alta afinidad y especificidad por dicho nucleótido. La cantidad de radioactividad en cada ensayo, que se corresponde con la cantidad



de AMPc marcado unido a dicha proteína, es inversamente proporcional al nivel de AMPc no marcado presente en el extracto celular. Mediante la interpolación en la curva de calibrado de los valores de radioactividad obtenidos se calcularon los niveles de AMPc de las muestras. El método es sencillo, rápido y muy sensible, la linealidad se mantiene en el rango de **0,2-16 pmoles de AMPc/tubo** en el caso del kit cAMP [<sup>3</sup>H] assay system, mientras que el rango de sensibilidad del kit que emplea [<sup>125</sup>I] es de 25-1600 fmol/tubo.

## **2.6.- Experimentos de inmunotransferencia.**

### **2.6.1.- Lisado de células y extracción de proteínas totales.**

<b>Tabla 14.- Tampón de carga 4X.</b>	
Glicerol	50%
Tris-HCl pH 6,8	125 mM
SDS	4%
Azul de Bromofenol	0,08%

Las células se sembraron en placas de cultivo de 10 cm de diámetro a una densidad de 4x10<sup>6</sup> células/placa y se dejaron hasta alcanzar confluencia. Antes de su utilización los astrocitos se lavaron con Locke normal durante dos horas a 37°C. Posteriormente, se llevaron a cabo los tratamientos indicados. Una vez finalizados éstos, se retiró el medio de incubación y se adicionaron 500 µl

de **tampón de carga**, de manera que la concentración de proteína total fuera de ≈ 1 µg/mL, concentración mínima requerida para el análisis de la activación de proteínas quinasas del ensayo Kinexus™ Protein Kinase Screen KPS-1.2 realizado por la empresa Kinexus Bioinformatics Corporation de Vancouver, Canadá. Los extractos obtenidos se desnaturalizaron calentándolos a 99°C durante 4 minutos. Muestras obtenidas de diferentes cultivos se mezclaron y se enviaron a Canadá para su análisis. Este ensayo estudia de forma fiable la posible activación de 75 proteínas quinasas detalladas en la Tabla 16. La estimulación de los astrocitos con agonistas de receptores de nucleótidos produjo un gran aumento de los niveles de fosforilación de las proteínas ERKs, PKD y glucógeno sintasa quinasa-3. Por ello, nos centramos en el estudio de estas vías de señalización.

### **2.6.2.- Electroforesis, transferencia y revelado de las membranas.**

<b>Tabla 15.- Tampón de electroforesis.</b>	
SDS	0,1%
Glicina	200 mM
Tris	25 mM
pH	8,3

El porcentaje de poliacrilamida de los geles y el volumen de los extractos desnaturalizados empleados en la electroforesis se determinaron en función de la proteína a estudiar. Las condiciones empleadas se detallan en los apartados dedicados a cada proteína. La electroforesis se desarrolló en **tampón de electroforesis**,



KINEXUS

Appendix B

## KINETWORKS™ PROTEIN KINASE SCREEN

Catalog Number KPKS – 1.2

KPKS-1.2 tracks the following seventy-five (75) protein kinases:

No.	Abbreviation	Full Name of Protein	Type
1.	AURORA	Aurora 2	PSTK
2.	BMX	Bone marrow X kinase	PSTK
3.	BTK	Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase	PYK
4.	CaMK1	Calmodulin-dependent kinase 1	PSTK
5.	CaMK4	Calmodulin-dependent kinase 4	PSTK
6.	CaMKK	Calmodulin-dependent kinase kinase	PSTK
7.	CDK1	Cyclin-dependent kinase 1 (Cdc2)	PSTK
8.	CDK2	Cyclin-dependent kinase 2	PSTK
9.	CDK4	Cyclin-dependent kinase 4	PSTK
10.	CDK5	Cyclin-dependent kinase 5	PSTK
11.	CDK6	Cyclin-dependent kinase 6	PSTK
12.	CDK7	Cyclin-dependent kinase 7	PSTK
13.	CDK9	Cyclin-dependent kinase 9	PSTK
14.	CK1δ	Casein kinase 1 delta	PSTK
15.	CK1ε	Casein kinase 1 epsilon	PSTK
16.	CK2	Casein kinase 2 alpha /alpha'/ alpha"	PSTK
17.	COT	Cancer Osaka thyroid oncogene (Tpl2)	PSTK
18.	CSK	Src tyrosine kinase	PYK
19.	DAPK	Death associated protein kinase 1	PSTK
20.	DNAPK	DNA-activated protein kinase	PSTK
21.	eEF2K	Elongation factor-2 kinase	PSTK
22.	ERK1	Extracellular regulated kinase 1	PSTK
23.	ERK2	Extracellular regulated kinase 2	PSTK
24.	ERK3	Extracellular regulated kinase 3	PSTK
25.	ERK6	Extracellular-regulated kinase 6	PSTK
26.	FAK	Focal adhesion kinase	PYK
27.	FYN	Fyn	PYK
28.	GCK	Germinal centre kinase	PSTK
29.	GRK2	G protein-coupled receptor kinase 2 (BARK2)	PSTK
30.	GSK3 α/β	Glycogen synthase kinase 3 alpha/beta	PSTK
31.	HPK1	Hematopoietic progenitor kinase 1	PSTK
32.	IKK α	Inhibitor NF κB kinase alpha	PSTK
33.	IKKβ	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells	PSTK
34.	JAK1	Janus kinase 1	PYK
35.	JAK2	Janus kinase 2	PYK
36.	KSR1	Kinase suppressor of Ras 1	PSTK
37.	LCK	Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase	PYK
38.	LYN	Lyn	PYK
39.	MEK1	MAP kinase kinase 1 (MKK1)	PTYK

Tabla 16.- Proteínas analizadas por Kinexus Bioinformatics Corporation.

a 4°C en el sistema mini-protean 3 de Bio Rad durante 100 minutos a amperaje constante, determinado por el grosor y porcentaje de poliacrilamida del gel. Uno de los pocillos del gel se reservó para la mezcla de patrones coloreados de pesos moleculares conocidos.

**Tabla 17.- Tampón de transferencia.**

Glicina	200 mM
Tris	25 mM
Metanol	20% (v/v)
pH	8,3

Tras el proceso electroforético, los geles se equilibraron durante media hora en **tampón de transferencia** y se transfirieron a una membrana de PVDF (equilibrada en el mismo tampón). El sistema de transferencia de Bio Rad empleado varió en función de la proteína a estudiar.

Finalizada la transferencia, la membrana se incubó 1 hora a temperatura ambiente con solución de bloqueo, compuesta por **TBS** con Tween-20 al 1% (v/v) en el que se había disuelto leche desnatada en polvo al 5% o BSA al 3% (p/v) dependiendo de la proteína estudiada.

**Tabla 18.- TBS.**

NaCl	100 mM
Tris.HCl	10 mM
pH	7,5

A continuación se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo. Seguidamente, la membrana se lavó tres veces durante 10 minutos cada vez alternando TBS con Tween-20 al 1% y TBS, para eliminar el exceso de anticuerpo. Posteriormente, se realizó la incubación con el anticuerpo secundario ligado a peroxidasa a 4°C

durante toda la noche. El exceso de anticuerpo secundario se eliminó mediante tres lavados como los realizados después de la incubación con el anticuerpo primario. Finalmente la membrana se reveló empleando Super Signal Substrate Western blotting siguiendo las instrucciones del fabricante (Pierce). Las imágenes de quimioluminiscencia se revelaron en el sistema Fluo-S Imager de BioRad. La densidad del marcaje inmunoreactivo se analizó empleando el programa Quantity One instalado en dicho equipo.

### 2.6.3.- Condiciones de los experimentos de inmunotransferencia para la detección de la proteína ERK.

Las proteínas quinasas ERK se detectaron empleando un anticuerpo comercial (Santa Cruz Biotechnology) monoclonal de ratón generado frente a una corta secuencia aminoacídica que contiene la Tyr<sup>204</sup> fosforilada de ERK 1, también presente en la isoforma ERK 2. Para cada uno de los tratamientos realizados se llevó a cabo, en paralelo, la detección de la forma no fosforilada de la isoforma ERK 2 usando un anticuerpo monoclonal de ratón de la misma casa comercial que reconoce una pequeña secuencia aminoacídica del extremo C-terminal de la proteína. Con este anticuerpo se detectan los niveles totales de ERK 2, que deben permanecer constantes a pesar de los tratamientos, lo que nos permitió comprobar si

todos los extractos contenían la misma cantidad de proteína.

Las condiciones específicas de los ensayos de inmunotransferencia para la detección de las proteínas quinasas ERK, tanto en su forma fosforilada como no fosforilada, son:

- Se cargaron 10  $\mu$ l (aproximadamente 10  $\mu$ g) de muestra en geles del 12% de poliacrilamida y 1 mm de grosor.
- Condiciones de la electroforesis: 100 minutos a un amperaje constante de 15 mA por gel.
- Transferencia durante 30 minutos a temperatura ambiente a 20 V en el sistema Semi-Dry Electroforetic Transfer Cell de Bio-Rad.
- Bloqueo con BSA al 3% en TBS con Tween-20 al 1%.
- Dilución 1/1000 del anticuerpo primario.
- Dilución 1/3000 del anticuerpo secundario ligado a peroxidasa (anti-IgG HRP de ratón).

#### **2.6.4.- Condiciones de los experimentos de inmunotransferencia para la detección de la proteína quinasa D.**

Para la detección de la proteína quinasa D fosforilada (p-PKD) se utilizó un anticuerpo policlonal obtenido en conejo y cedido por el laboratorio de la Dra. Teresa Iglesias del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” de Madrid. Dicho anticuerpo reconoce el residuo Ser<sup>916</sup> fosforilado de dicha proteína. En algunos extractos se detectó paralelamente la forma no fosforilada, PKD total, con un anticuerpo policlonal obtenido en conejo dirigido frente a los 17 últimos residuos del extremo C-terminal de PKD1 y PKD2 (Santa Cruz Biotechnologies). Además, en los experimentos en los que se estudió la activación de PKD1 por BzATP en función del tiempo se empleó un anticuerpo que reconoce los residuos fosforilados Ser<sup>744</sup>/Ser<sup>748</sup> (Santa Cruz Biotechnologies), para ello es necesario que ambos aminoácidos se encuentren en su forma fosforilada. En todos los casos, como control de carga se utilizó la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, GADPH (Ambion), cuya expresión no debe variar con los tratamientos realizados. Las condiciones de los ensayos de inmunotransferencia fueron:

- Se cargaron 50  $\mu$ l (aproximadamente 50  $\mu$ g) de muestra en geles del 7,5% de poliacrilamida y 1,5 mm de espesor.
- Condiciones de la electroforesis: 100 minutos a un amperaje constante de 20-25 mA por gel.
- Transferencia durante 80 minutos a 4°C a 240 mA en el sistema Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer cell de Bio Rad.
- Bloqueo con leche en polvo desnatada preparada al 5% en TBS con Tween-20 al 1%.
- Dilución 1/1000 del anticuerpo primario.
- Dilución 1/3000 del anticuerpo secundario ligado a peroxidasa (anti-IgG

HRP de conejo, para los anticuerpos primarios que reconocen la PKD y anti-IgG HRP de ratón para la enzima GADPH).

## **2.7.- Determinación de proteínas.**

La concentración de proteínas celulares se cuantificó por el método de Bradford (1976) por su alta sensibilidad, en el rango del  $\mu\text{g}$ , utilizando el reactivo de Bradford suministrado por BioRad. El método está basado en el cambio en el espectro de absorción que experimenta el tinte Azul Brillante de Coomassie G-250 al interaccionar con proteínas, aumentando su absorción a 595 nm.

Como patrón se utilizó albúmina de suero bovino (BSA), de la que se prepararon 100  $\mu\text{l}$  de distintas diluciones que contenían entre 0 y 75  $\mu\text{g}$  de proteína, para construir la recta patrón. Las muestras problemas también se ajustaron a dicho volumen. Seguidamente, se adicionaron 5 mL de reactivo Bradford comercial, diluido 1:5. La concentración de proteínas de cada uno de los lisados celulares se determinó interpolando su valor de absorbancia a 595 nm en la recta patrón.

La linealidad de la reacción se mantiene en un rango de 20-140  $\mu\text{g}$  (200-1400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de proteína.

## **2.8.- Expresión de los receptores P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>13</sub> en células de astrocitoma 1321N1.**

### **2.8.1.- Obtención del plásmido con la secuencia del receptor P2Y<sub>13</sub>.**

Mediante técnicas de PCR se llevó a cabo la amplificación de la secuencia de DNA que codifica para el receptor P2Y<sub>13</sub> a partir de DNA obtenido de células sanguíneas humanas. La enzima utilizada fue *Pfu* DNA polimerasa y la amplificación se realizó mediante 35 ciclos con las siguientes condiciones: 95°C, 1 minuto; 55°C, 1 minuto; 68°C, 2 minutos. Los oligonucleótidos utilizados fueron:

Oligonucleótido sentido:

CGACTAGTGCCGCCACCATGAACACCACAGTGATGCAAGG

SpeI                      Kozak

Oligonucleótido antisentido:

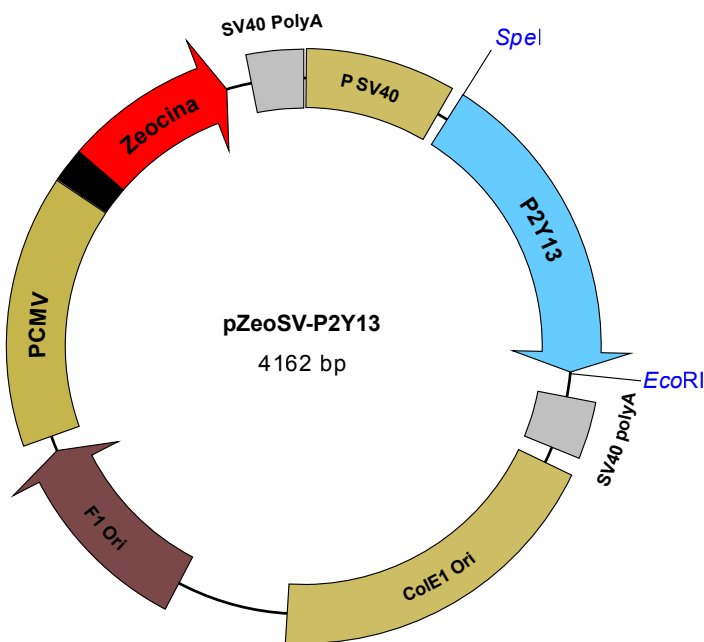
CAGAATTTCAGCCTAAGGTTATGTTGTCTG

EcoRI

El producto de PCR se visualizó en un gel del 1,5% de agarosa con bromuro de etidio, la banda obtenida tenía un peso molecular de aproximadamente 1,1 Kb coincidiendo con el tamaño esperado.

Posteriormente, se realizó la digestión del producto de PCR y del vector pZeo, en el cual se quería insertar la secuencia del receptor P2Y<sub>13</sub>, con las enzimas de restricción SpeI y EcoRI durante 2 horas a 37°C seguido de 10 minutos a 70°C para desnaturalizar las enzimas.

También se llevó a cabo la desfosforilación del plásmido pZeo con la enzima BAP durante 1 hora a 60°C. Este vector posee un gen de resistencia a zeocina que posteriormente nos permitiría seleccionar las colonias de bacterias transformadas y las células transfectadas con el plásmido. En la figura 26, se representa un esquema de los componentes más importantes de este plásmido.



**Figura 26.- Mapa del vector pZeoSV con el inserto de la secuencia del receptor P2Y<sub>13</sub>.**

A continuación, se llevó a cabo la purificación de los productos de las digestiones mediante el kit QIAquick Gel extraction comercializado por Qiagen y se realizó la ligación de la secuencia del receptor P2Y<sub>13</sub> purificada y del vector pZeo con una relación de 3:1. Para ello, se utilizó el kit Ready-To-Go™ T4 DNA Ligase de Amersham Biosciences.

Posteriormente, se llevó a cabo la transformación de bacterias competentes *E. Coli TOP10F* comercializadas por Invitrogen siguiendo las instrucciones del fabricante. Las bacterias se dejaron crecer en placas de agar con zeocina 25 µg/mL durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente se seleccionaron varias colonias para realizar una minipreparación del plásmido con High Pure Plasmid Isolation Kit comercializado por Roche, los productos de estas minipreparaciones se digirieron con SpeI y EcoRI y se visualizaron en un gel de agarosa para determinar si contenían insertada la secuencia del receptor P2Y<sub>13</sub>. A continuación, se llevó a cabo la secuenciación de los productos de las minipreparaciones de aquellas colonias que habían incorporado el inserto, para ello se utilizó el kit Abi Prism<sup>R</sup> Bigdye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit de Applied Biosystems.

Posteriormente, se eligió una de las colonias de bacterias que había incorporado el

plásmido con la secuencia correcta del receptor P2Y<sub>13</sub>. Esta colonia se creció en presencia de zeocina 25 µg/mL y se realizó una maxipreparación del plásmido empleando EndoFree Plasmid Maxi Kit de Quiagen. Con el plásmido obtenido se procedió a transfectar células de astrocitoma 1321N1 y una línea establemente transfectada con el receptor P2Y<sub>1</sub>, denominada CL5010, que había sido obtenida anteriormente en el laboratorio del Dr. Christian Gachet.

### **2.8.2.- Obtención de células establemente transfectadas.**

Las células, tanto las 1321N1 como las CL5010, se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 200.000 células/pocillo. Al día siguiente, se llevó a cabo la transfección, utilizando el reactivo multilipídico FuGENE 6 de Roche según las indicaciones del fabricante utilizando una relación de FuGENE:DNA de 3:1.

Al cabo de dos días, las células se tripsinizaron y se dividieron en varias placas de 10 cm de diámetro con diferentes diluciones celulares. El medio utilizado contenía zeocina 200 µg/mL. Además en el caso de las células CL5010, también se adicionó geneticina 600 µg/mL, ya que el plásmido en el que se había clonado la secuencia del receptor P2Y<sub>1</sub> contenía un gen de resistencia a este antibiótico.

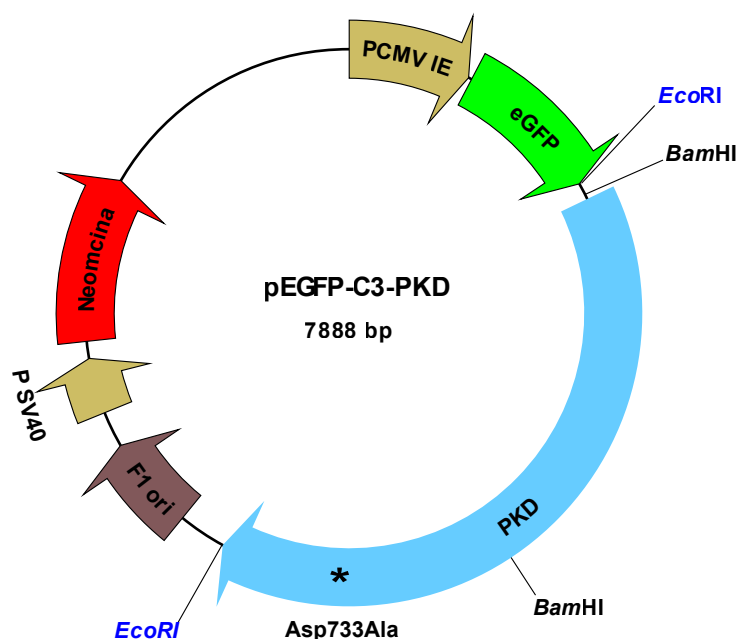
Las células se dejaron crecer en el incubador hasta que se observó que habían crecido clones aislados, una vez que estos eran bien visibles a simple vista se tripsinizaron de forma separada y se pasaron de manera individual a pocillos de una placa de 24 pocillos. Cuando alcanzaron la confluencia se pasaron a placas de 6 pocillos y por último a placas de 10 cm de diámetro. Por último, se analizó la inhibición de la producción de AMPc inducida por Forskolina por agonistas del receptor P2Y<sub>13</sub>, para comprobar que clones expresaban este receptor funcional.

## **2.9.- Sobreexpresión de PKD activa y de PKD quinasa-inactiva en astrocitos de cerebelo.**

### **2.9.1.- Construcción de los plásmidos.**

Las secuencias que codifican la PKD activa y PKD quinasa-inactiva (con la mutación Asp733Ala que impide la actividad quinasa (Iglesias y cols., 1998)), se obtuvieron a partir de construcciones cedidas por la Dra. Teresa Iglesias (pEFBoss-PKDwt para PKD activa y pEFBoss-KM para PKD quinasa-inactiva). Los cDNAs se subclonaron mediante la digestión de estos plásmidos con la enzima de restricción EcoRI. El tamaño de los fragmentos obtenidos fue de 3.1 Kb. Dichos fragmentos se insertaron en el plásmido pEGFP-C3 (Clontech), previamente digerido con la enzima EcoRI. La elección del plásmido se realizó para que la secuencia quedara en fase de lectura y obtener una proteína de fusión con las secuencias de PKD activa y de PKD quinasa-inactiva con una cola de eGFP en el extremo N-terminal. En la figura 27 se muestra un esquema de los componentes más importantes del plásmido.





**Figura 27.- Mapa del vector de sobreexpresión de PKD.** Las secuencias insertadas de la PKD activa e inactiva se diferencian en un solo residuo, la forma inactiva presenta la mutación Asp733Ala.

### 2.9.2.- Transfección transitoria de las células.

Las transfecciones se realizaron, al día siguiente de sembrar las células, en placas petri de 35 mm de diámetro a una densidad de 30.000 células/cm<sup>2</sup>, en OPTIMEM con el reactivo catiónico Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Madrid) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las cantidades de DNA y Lipofectamina 2000 empleadas fueron de 1 µg/placa y 2.5 µl/placa, respectivamente. El medio de transfección se mantuvo durante 3 horas, transcurridas las cuales se reemplazó por el medio de cultivo habitual (DMEM suplementado con el 10% de suero).

Las células se utilizaron 48 horas después de la transfección para estudiar cambios en la distribución de PKD activa y de PKD quinasa-inactiva después de la estimulación con diferentes nucleótidos. La visualización de las células se realizó en un microscopio Nikon Eclipse TE2000-E, con un objetivo Plan Apo de inmersión en aceite 60X1.4. Las células se iluminaron a una longitud de onda de 470 nm seleccionada con un monocromador Cairn Optoscan Power, la luz emitida por la GFP atraviesa un espejo dicróico y es conducida a una cámara Hamamatsu C4742-98 después de pasar por un filtro interferencial de ancho de banda centrado a 510 nm. Todo el sistema estaba controlado por el Software MetaMorph 6.3r6 (Universal Imaging Corp, Cambridge, UK) que nos permitía tomar imágenes cada tres minutos durante 1 hora.



### **2.10.- Estudios de viabilidad celular.**

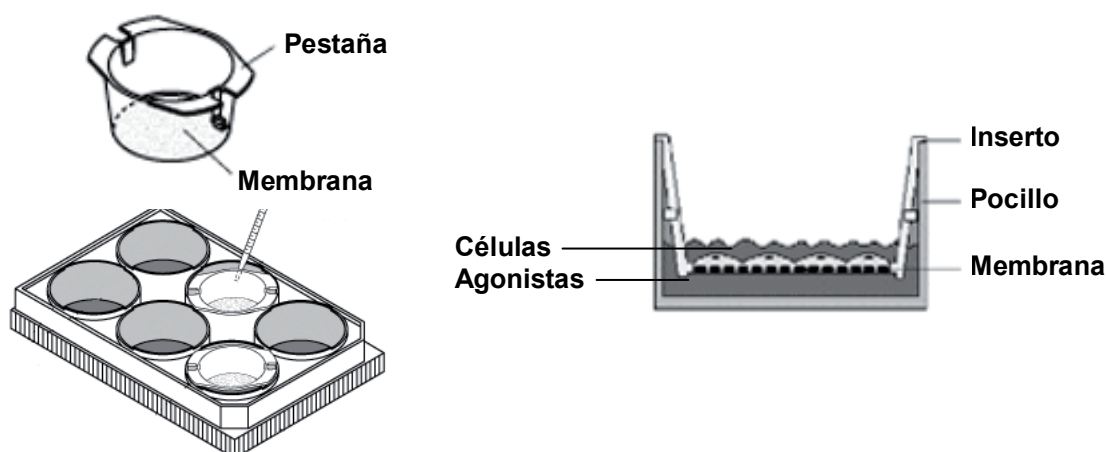
Los astrocitos se sembraron en cubreobjetos de 15 mm de diámetro colocados en placas de 6 pocillos a una densidad de 500.000 células/pocillo. Al día siguiente los cubreobjetos, de forma individual, se lavaron durante 10 minutos con 1 mL de solución Locke normal y se incubaron con los agonistas durante el tiempo indicado. Posteriormente, se empleó el kit LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit for mammalian cells comercializado por Molecular Probes para analizar la viabilidad celular. Este método está basado en la medida de la actividad esterasa de las células vivas, determinada por la transformación de calceína-AM no fluorescente, que puede atravesar la membrana plasmática, en calceína libre que queda retenida en el citosol y emite fluorescencia verde a 510 nm cuando se excita a una longitud de onda de 495 nm. Por otro lado, se emplea el homodímero-1 de etidio que puede penetrar en aquellas células con daño en la membrana y unirse a los ácidos nucleicos. Cuando esta interacción tiene lugar la sonda emite fluorescencia roja a 635 nm al ser excitada a 495 nm. De esta forma, cuando los astrocitos fijados en los cubreobjetos se iluminan a 495 nm, las células viables emiten fluorescencia verde y las no viables emiten fluorescencia roja.

### **2.11.- Experimentos de entrada de la sonda Yo-Pro-1.**

Este compuesto, cuando se une a DNA, emite fluorescencia a 509 nm al ser excitado con una longitud de onda de 491 nm. En estos ensayos se utilizaron poblaciones de 750.000 células en suspensión similares a las utilizadas en las medidas fluorimétricas de calcio, apartado 2.3.2 de Métodos. Los astrocitos se resuspendieron en 1,5 mL de Locke normal, se transfirieron a cubetas termostatzadas con agitación y se les adicionó 2  $\mu$ M de Yo-Pro-1 (Invitrogen). Posteriormente, se estimularon con 100  $\mu$ M BzATP y las variaciones en la fluorescencia se monitorizaron de manera continua en un fluorímetro. Al final del experimento las células se lisaron con Triton X-100 (0,3%) para obtener la fluorescencia máxima.

### **2.12.- Estudios de migración celular.**

En estos ensayos se utilizaron placas de 6 pocillos diseñadas para el uso de insertos de cultivo celular (Costar). El tamaño de poro de la membrana del inserto era de 8,0  $\mu$ m. En la parte inferior de la placa se colocó medio con diferentes agonistas, mientras que los astrocitos se sembraron a una densidad de 300.000 células/pocillo, en la parte superior sobre la superficie de la membrana del inserto. Al día siguiente, la membrana del inserto se separó de su soporte, las células adheridas a la superficie inferior de la membrana del inserto, aquella que había estado en contacto con los agonistas, se fijaron con paraformaldehído al 4%, se tiñeron los núcleos con la sonda fluorescente DAPI y se contó el número de células unidas a la cara inferior de la membrana del inserto en cada condición. En la figura 28 se muestra un esquema del dispositivo utilizado.



**Figura 28.- Dispositivo utilizado en los ensayos de migración.** Los insertos de cultivo se colocaron en los pocillos de la placa. El medio con los nucleótidos se depositó cuidadosamente en la parte inferior del pocillo, mientras que las células se depositaron sobre la membrana del inserto. Al día siguiente, el inserto se separó del pocillo, se recortó la membrana y se le dio la vuelta, ya que las células que habían migrado se encontraban adheridas a la cara inferior de la membrana. Los astrocitos se fijaron con paraformaldehído al 4% y los núcleos se tiñeron con DAPI.

### **2.13.- Análisis estadístico y presentación de resultados.**

Los datos obtenidos se presentan, en general, como la media aritmética  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). Los resultados mostrados en este trabajo corresponden a un mínimo de tres experimentos, realizados al menos con tres cultivos diferentes, cada uno a partir de material obtenido de diversos individuos, normalmente seis ratas de siete días de la misma camada. En el caso de los experimentos de microfluorimetría el número de células individuales ensayadas en cada protocolo aparece indicado en el texto del pie de figura.

Las comparaciones entre medias se realizaron con un análisis de la varianza (ANOVA), reducida a simple t de Student en el caso de comparaciones entre solo dos medias. Los niveles de significación establecidos han sido:

- $P < 0,001$ , diferencia extremadamente significativa (\*\*\*).
- $P < 0,01$ , diferencia significativa (\*\*)
- $P < 0,05$ , diferencia marginalmente significativa (\*).
- $P > 0,5$ , diferencia no significativa (n.s).

Para un análisis posterior a la obtención de un ANOVA inferior a 0,05, se utilizó el post-test de Bonferroni, o bien, el test de Dunnet.





## **Resultados**

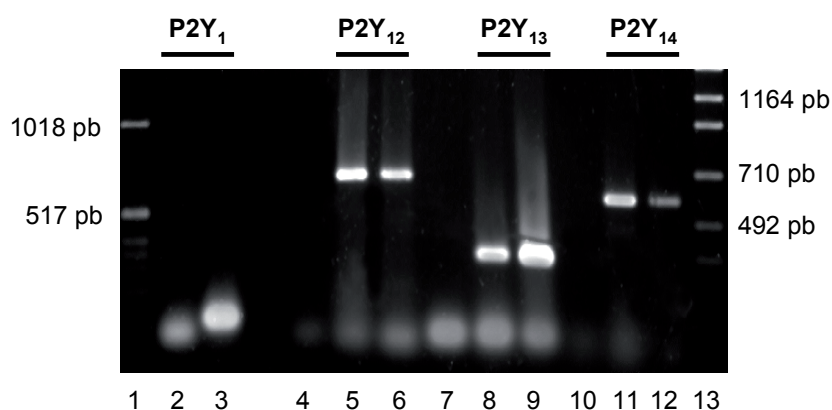


## 1.- CARACTERIZACIÓN DE LOS RECEPTORES DE ADP PRESENTES EN LOS ASTROCITOS TIPO 1 DE CEREBELO DE RATA Y SU SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR.

Como se ha comentado anteriormente, las acciones extracelulares del ADP pueden estar mediadas por tres subtipos de receptores metabotrópicos de nucleótidos los receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub> y P2Y<sub>13</sub>. En trabajos anteriores, nuestro grupo había demostrado que los astrocitos de cerebelo expresaban receptores tipo P2Y<sub>1</sub> funcionales homogéneamente distribuidos en toda la población de astrocitos. Su caracterización se había llevado a cabo con las herramientas disponibles en aquel momento, el agonista 2MeSATP y el antagonista selectivo de este receptor, un derivado del ADP, el compuesto MRS-2179 (Jimenez y cols., 2002). El clonaje y la caracterización de los receptores P2Y<sub>12</sub> y P2Y<sub>13</sub> (Hollopeter y cols., 2001; Zhang y cols., 2001; Communi y cols., 2001b), así como la detección de una elevada densidad de receptores de ADP acoplados a proteínas G<sub>i/o</sub> en diversas áreas del SNC, entre ellas la sustancia blanca del cerebelo (Laitinen y cols., 2001), nos llevó a preguntarnos si alguno de estos receptores se expresaba en los astrocitos de cerebelo de rata. Para ello, decidimos emplear un nuevo agonista, el 2MeSADP, ya que el receptor P2Y<sub>12</sub> es insensible a ATP y su análogo estructural 2MeSATP es un agonista parcial y muy débil del receptor P2Y<sub>13</sub>.

### 1.1.- Identificación de los receptores de ADP presentes en los astrocitos de cerebelo.

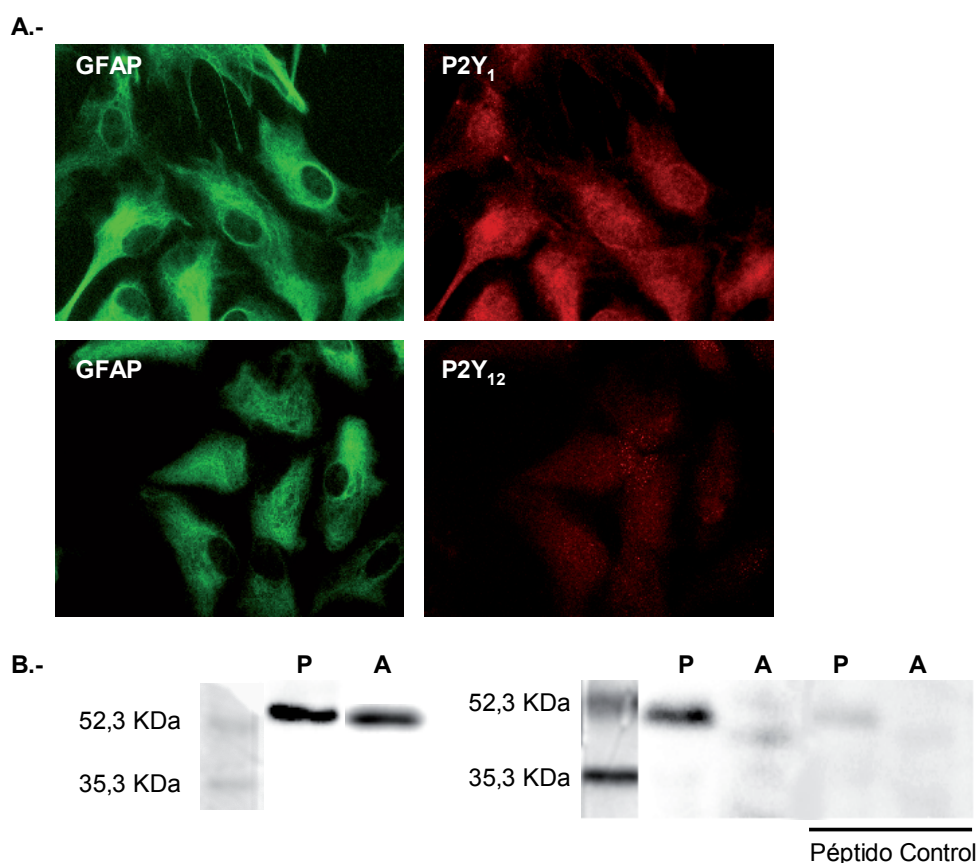
En primer lugar se analizó la presencia del mRNA que codifica para los diferentes subtipos mediante experimentos de RT-PCR a partir de RNA obtenido de cultivos confluentes de astrocitos cerebelosos, según se describe en el apartado de Métodos (figura 29).



**Figura 29.- Expresión de mRNA para los receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> y P2Y<sub>14</sub> en cultivos de astrocitos de cerebelo.** Los productos de PCR para cada receptor se separaron en geles de agarosa al 2% (calles 3, 5, 8 y 11). Como controles de expresión se utilizó RNA total obtenido de plaquetas para el receptor P2Y<sub>12</sub> (calle 6), de bazo para el receptor P2Y<sub>13</sub> (calle 9) y de hipocampo para el receptor P2Y<sub>14</sub>, (calle 12). Para cada receptor se realizaron controles con agua en lugar de cDNA (calles 2, 4, 7 y 10). El tamaño de las bandas se determinó usando patrones de RNA. El RNA se obtuvo de tres cultivos diferentes.

Como se muestra en la figura 29, se detectaron niveles de expresión elevados para los tres receptores de ADP, al igual que para el receptor de UDP-glucosa, denominado P2Y<sub>14</sub>, que pertenece a la misma subfamilia estructural.

Como la detección del mRNA no implica la presencia de la correspondiente proteína, pasamos a comprobar la expresión y localización de estos receptores empleando técnicas inmunocitoquímicas. En aquel momento, no se disponía de anticuerpos comerciales para los receptores P2Y<sub>13</sub> y P2Y<sub>14</sub>, por tanto únicamente pudimos chequear la presencia de los receptores P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>12</sub> (figura 30).



**Figura 30.- Detección de las proteínas de los receptores P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>12</sub> en cultivo de astrocitos de cerebelo.** **A.-** Los astrocitos se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4%. Posteriormente, se procedió a la identificación celular con anticuerpos específicos frente a la GFAP (1:200) y a los receptores P2Y<sub>1</sub> (1:100) y P2Y<sub>12</sub> (1:50). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron FICT, para revelar la GFAP, y TRICT para revelar los dos subtipos de receptores purinérgicos. Los dos anticuerpos secundarios se utilizaron a una dilución 1:500. **B.-** Extractos de proteína total obtenidos de cultivos de astrocitos de cerebelo (A) y extractos de la fracción de membrana de plaquetas (P) se sometieron a electroforesis PAGE-SDS en geles del 12% de poliacrilamida. Los anticuerpos frente a los receptores P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>12</sub> se utilizaron a una dilución 1:200 y se revelaron con un anticuerpo frente a IgG de conejo unido a HRP (1:3000). Donde se indica el anticuerpo que reconoce al receptor P2Y<sub>12</sub> se preincubó durante una hora con el péptido control antes de la incubación con las muestras.

En la figura 30, se observa la existencia de un marcaje específico obtenido con el anticuerpo frente al receptor  $P2Y_1$ . Por el contrario, no se detectó marcaje específico con el anticuerpo del receptor  $P2Y_{12}$ . Para comprobar que este anticuerpo funcionaba correctamente, realizamos experimentos de inmunotransferencia con extractos de membranas de plaquetas, tejido donde este receptor se expresa abundantemente. Las plaquetas se obtuvieron por centrifugación durante 10 minutos a  $700 \times g$  de plasma enriquecido en plaquetas humanas, y posteriormente se llevó a cabo el aislamiento de la fracción de membrana mediante homogeneización mecánica y posterior centrifugación a  $100.000 \times g$  durante 1 hora, a  $4^\circ\text{C}$ . Como se muestra en la figura, en estos extractos sí se detectó una banda del peso molecular esperado para el receptor  $P2Y_{12}$ , que se eliminó al preincubar el anticuerpo con el péptido control, lo que confirmó el buen estado del anticuerpo. En los extractos de astrocitos no se obtuvo ninguna señal, mientras que si se reveló una banda del tamaño esperado para el receptor  $P2Y_1$ . Estos estudios indicaron que el receptor  $P2Y_{12}$  no parecía estar presente en los astrocitos cerebelosos. Puesto que no fue posible la detección de la proteína del receptor  $P2Y_{13}$ , pasamos a realizar estudios funcionales con el objetivo de caracterizar estos receptores.

## **1.2.- Inhibición de la producción de AMPc por receptores de ADP acoplados a proteínas**

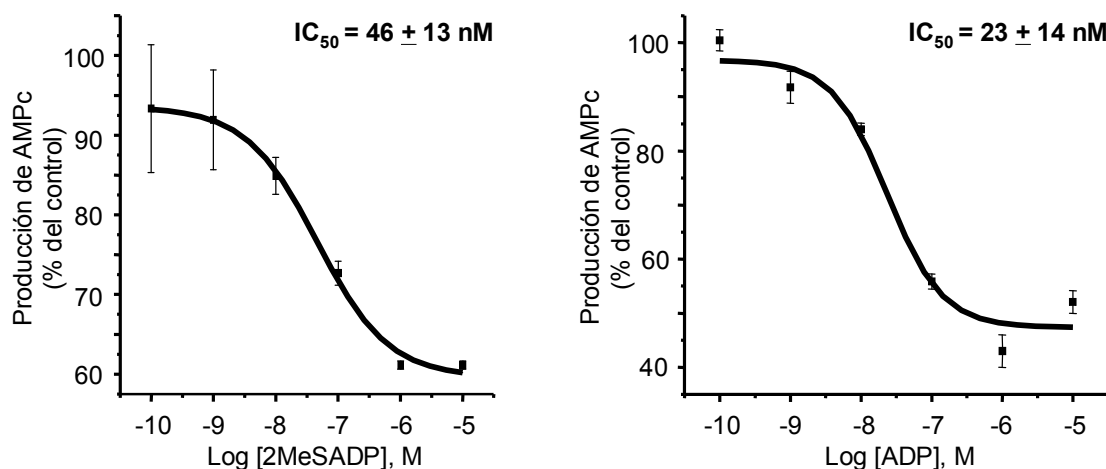
### **G.**

Una de las características que diferencian a los receptores  $P2Y_{12}$  y  $P2Y_{13}$  del resto de receptores  $P2Y$  conocidos, es su capacidad para inhibir a la enzima adenilato ciclasa (Hollopeter y cols., 2001; Communi y cols., 2001b). Teniendo en cuenta que los astrocitos de cerebelo poseen receptores  $\beta$ -adrenérgicos acoplados positivamente al sistema adenilato ciclasa, los estudios funcionales se llevaron a cabo analizando el efecto del ADP y del 2MeSADP, agonistas específicos de ambos subtipos de receptores  $P2Y$ , sobre la producción de AMPc inducida por isoproterenol. Estos experimentos se realizaron en presencia de  $10 \mu\text{M}$  de MRS-2179, antagonista del receptor  $P2Y_1$ , para evitar posibles interacciones con este receptor. Además, en el medio de incubación también se añadió adenosina deaminasa con el fin de eliminar las acciones de la adenosina que se pudiera estar generando tras la hidrólisis de los nucleótidos, ya que los astrocitos expresan receptores de adenosina tipo  $A_{2B}$  acoplados a la activación de la adenilato ciclasa (Jimenez y cols., 1999).

La coestimulación de los astrocitos con isoproterenol y 2MeSADP o ADP redujo la producción de AMPc, inducida por el agonista  $\beta$ -adrenérgico, de manera dosis dependiente, con un máximo de inhibición del 40% a concentraciones de  $10 \mu\text{M}$  del nucleótido (figura 31). Los valores de  $IC_{50}$  obtenidos fueron  $46 \pm 13$  y  $23 \pm 14$  nM para 2MeSADP y ADP, respectivamente. El tratamiento con los nucleótidos no modificó los niveles basales de AMPc (figura 32). Estos resultados sugerían que el receptor implicado era el subtipo  $P2Y_{13}$ , que es activado con la misma potencia por ambos agonistas. El perfil farmacológico del receptor  $P2Y_{12}$  es diferente, el 2MeSADP es 30-40 veces más potente que el ADP, si bien el



porcentaje máximo de inhibición es similar para ambos subtipos de receptores, un 40-50% de inhibición (Hollopeter y cols., 2001; Zhang y cols., 2001; Communi y cols., 2001b 2002; Marteau y cols., 2003).

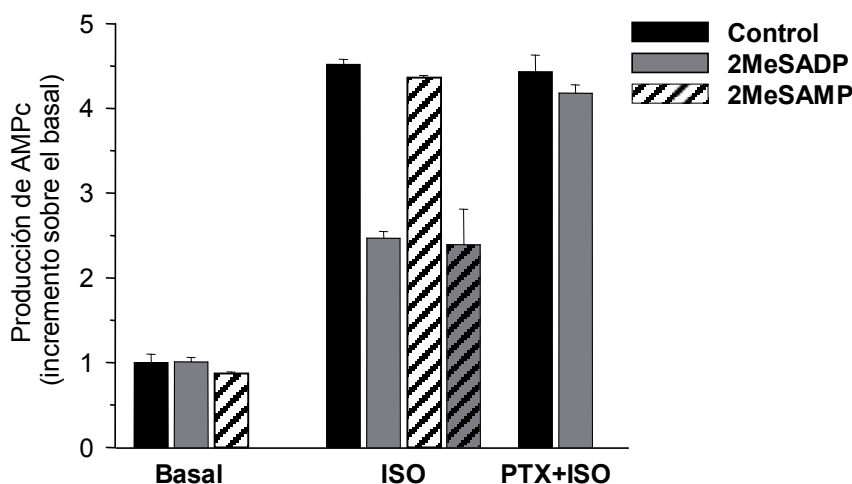


**Figura 31.- Curvas de inhibición para 2MeSADP y ADP de la producción de AMPc inducida por isoproterenol en astrocitos de cerebelo.** Las células se preincubaron 3 minutos con 10  $\mu$ M MRS-2179 antes de ser coestimuladas durante 3 minutos con diferentes concentraciones de agonista y 10  $\mu$ M de isoproterenol. La cantidad de AMPc se calculó tal y como se describe en el apartado de métodos. Para cada experimento los datos se normalizaron con respecto al control. Los valores representados corresponden a la media  $\pm$  SD de cinco experimentos realizados por triplicado. Las curvas se ajustaron mediante regresión no lineal.

En el caso del receptor P2Y<sub>13</sub>, varios grupos han observado que su activación ejerce un efecto bifásico sobre la producción de AMPc. A bajas concentraciones de agonista, tiene lugar una inhibición de la adenilato ciclasa, mientras que a concentraciones superiores a 10  $\mu$ M se produce un ligero aumento de la producción de AMPc (Communi y cols., 2001b; Marteau y cols., 2003). Este fenómeno también se ha descrito para otros receptores, por ejemplo, para el receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico (Eason y cols., 1992; Chabre y cols., 1994). Una posible explicación es que se produzca el acoplamiento a distintas proteínas G. Sin embargo, en nuestro modelo este efecto no se ha observado.

Para confirmar que el receptor responsable de la inhibición de la adenilato ciclasa en los astrocitos de cerebelo era el receptor P2Y<sub>13</sub>, analizamos el efecto de un antagonista del receptor P2Y<sub>12</sub>, el 2MeSAMP. Como se observa en la figura 32, la preincubación de los astrocitos con este compuesto no revirtió la inhibición de la producción de AMPc inducida por 2MeSADP. En la misma figura, se muestra como la respuesta se bloqueó completamente al tratar las células con *toxina pertussis* 100 ng/mL durante toda la noche, poniendo de manifiesto la participación de proteínas G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub>, como era de esperar en base a los trabajos publicados por otros autores (Hollopeter y cols., 2001; Takasaki y cols., 2001;

Communi y cols., 2001b; Zhang y cols., 2002; Marteau y cols., 2003; Fumagalli y cols., 2004). Estos resultados confirmaban la presencia de un receptor  $P2Y_{13}$ -like en los astrocitos cerebelosos.



**Figura 32.- Efecto de 2MeSAMP y *toxina pertussis* en la inhibición por 2MeSADP de la producción de AMPc inducida por isoproterenol en astrocitos de cerebelo.** Para estudiar el efecto del antagonista del receptor  $P2Y_{12}$  las células se preincubaron durante 3 minutos con 100  $\mu$ M de 2MeSAMP y 10  $\mu$ M de MRS-2179 antes de la coestimulación con 10  $\mu$ M de 2MeSADP y 10  $\mu$ M de isoproterenol durante 3 minutos. Para analizar el efecto de la *toxina pertussis* los astrocitos se incubaron toda la noche con 100 ng/mL de dicha toxina. En cada experimento los datos se normalizaron respecto al control. Los valores representados corresponden a la media  $\pm$  SD de cuatro experimentos realizados en cuádruplicado.

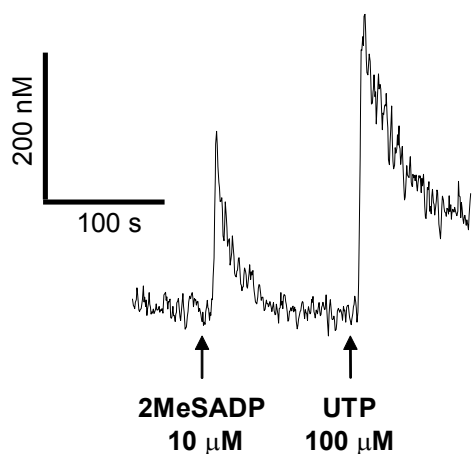
### **1.3.- Caracterización de las respuestas de calcio inducidas por 2MeSADP en los astrocitos tipo 1 de cerebelo.**

A diferencia del receptor  $P2Y_{12}$ , el receptor  $P2Y_{13}$  también podría estar acoplado a otra gran cascada de señalización intracelular, la activación de la fosfolipasa C, generando diacilglicerol e  $IP_3$  (Communi y cols., 2001b). Por ello, decidimos estudiar si en los astrocitos de cerebelo este receptor inducía la movilización de calcio intracelular, sin olvidar que el 2MeSADP también es agonista del receptor  $P2Y_1$  con una afinidad similar a la del receptor  $P2Y_{13}$ .

#### **1.3.1.- Respuestas de calcio inducidas por 2MeSADP en poblaciones celulares.**

En una primera aproximación, se analizaron las respuestas de calcio en poblaciones celulares mediante ensayos fluorimétricos con la sonda fura-2, como se describe en el apartado de Métodos. En el caso de observar respuestas de calcio independientes del receptor  $P2Y_1$ , se pasaría a su caracterización en células individuales. La estimulación de los astrocitos con 2MeSADP 10  $\mu$ M indujo respuestas de calcio, con una magnitud de  $360 \pm 45$  nM, similares

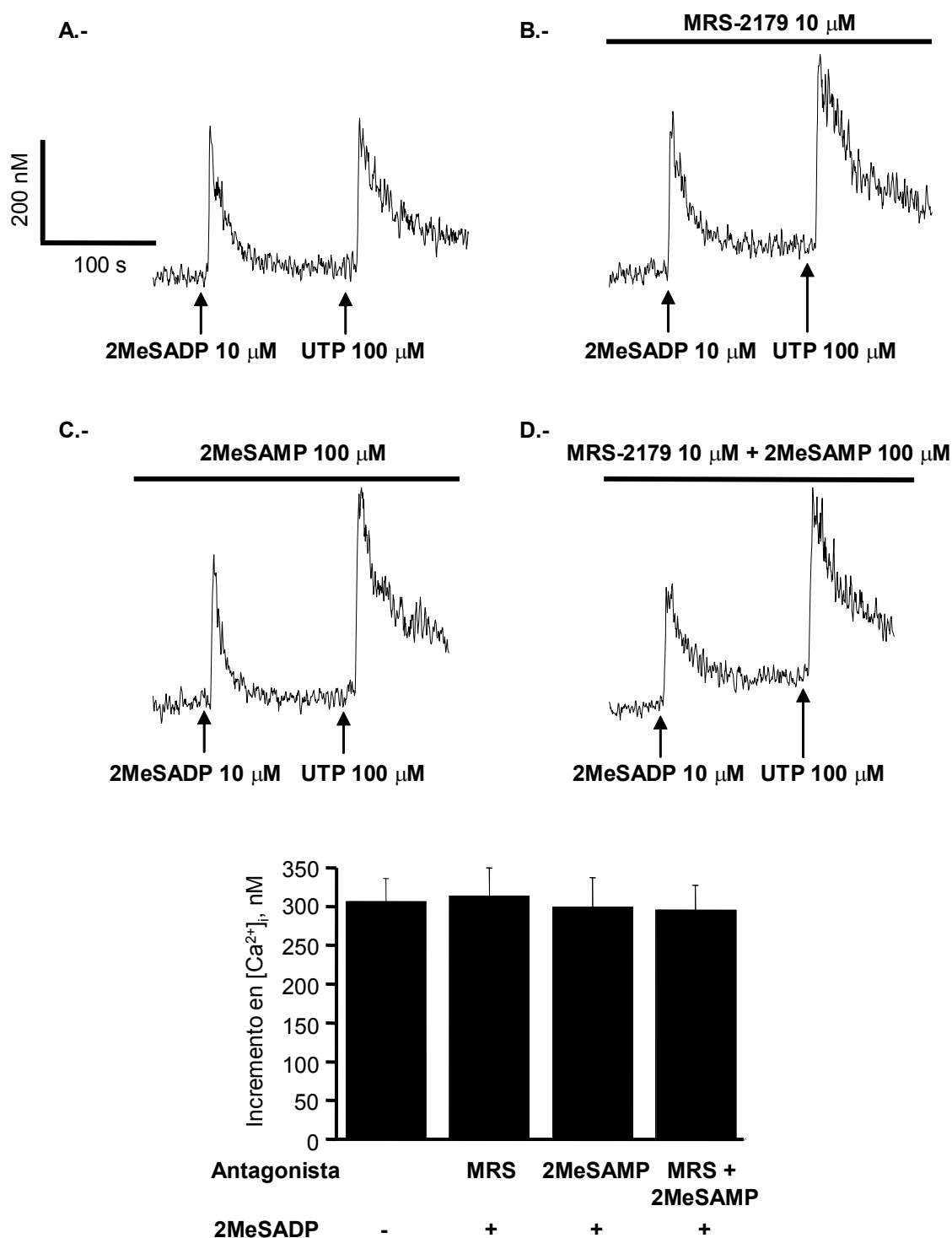
o ligeramente inferiores a las producidas por UTP (figura 33). Estas últimas están mediadas por los receptores  $P2Y_2/P2Y_4$ , los cuales se coexpresan junto con los receptores  $P2Y_1$  en toda la población de astrocitos (Jimenez y cols., 2000).



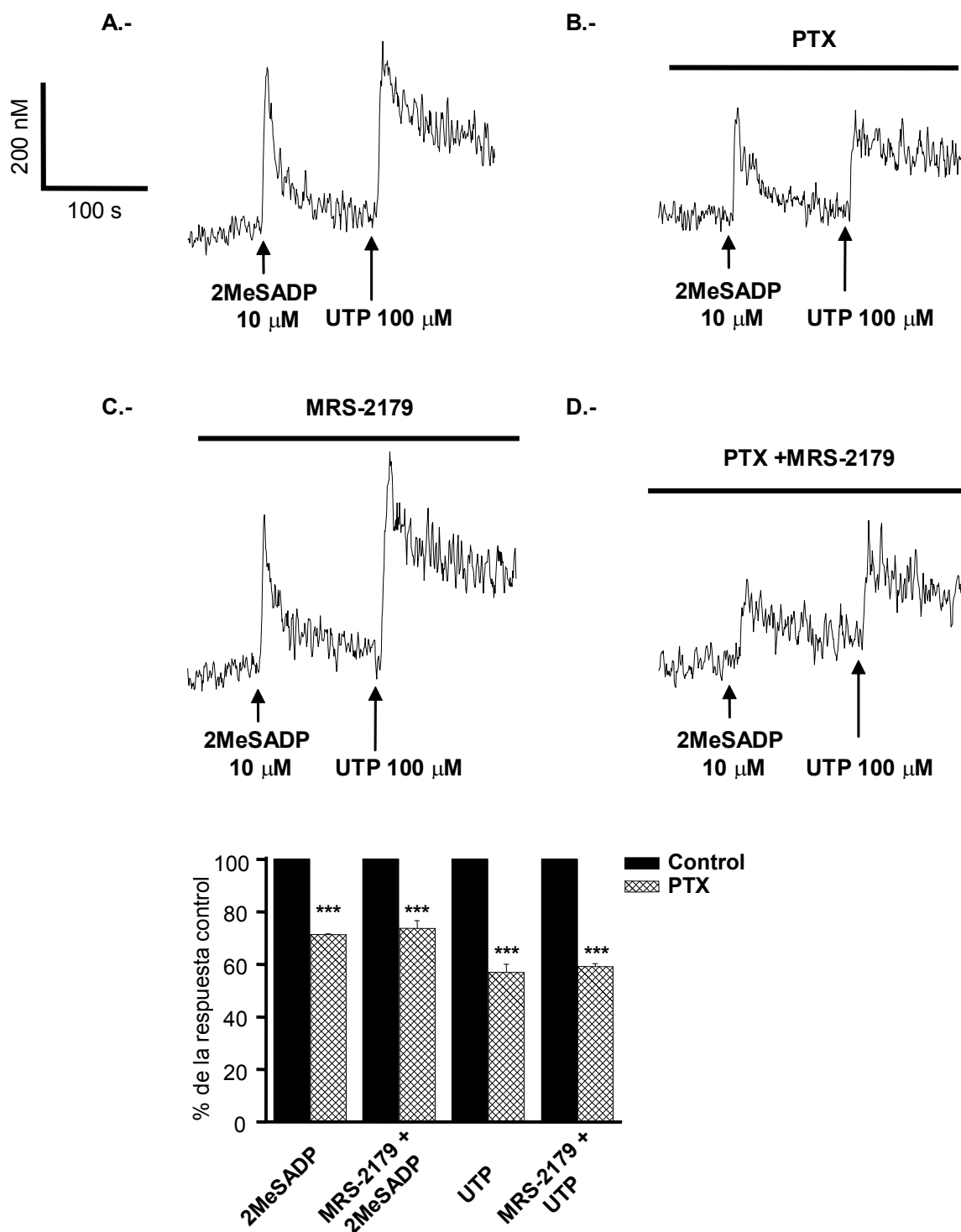
**Figura 33.- Respuestas de calcio inducidas por 2MeSADP 10  $\mu$ M y UTP 100  $\mu$ M en poblaciones de astrocitos tipo 1.** Las células en suspensión se estimularon con 2MeSADP 10  $\mu$ M. Una vez recuperado el nivel basal, se realizó una segunda aplicación con 100  $\mu$ M UTP. La figura muestra un registro típico obtenido en dichas condiciones.

Para identificar que receptor o receptores estaban implicados en las respuestas de 2MeSADP, las células se preincubaron con los antagonistas MRS-2179 y 2MeSAMP antes de ser estimuladas con el agonista. En la figura 34, puede observarse que la preincubación con estos compuestos no afectó significativamente las respuestas de calcio inducidas por 2MeSADP, que tampoco se bloquearon al incrementarse la concentración de MRS-2179 hasta 100  $\mu$ M. Estos datos sugieren que, al menos a la concentración de agonista ensayada, 10  $\mu$ M, las señales de intracelulares de calcio no están mediadas por el receptor  $P2Y_1$ . Como era de esperar, también quedó descartada la implicación del receptor  $P2Y_{12}$  en estas respuestas, confirmando los resultados anteriores.

Con el objetivo de conocer que tipo de proteína G podía estar involucrada, estudiamos la sensibilidad de las respuestas de calcio al tratamiento con la *toxina pertussis*, tanto en presencia como en ausencia de MRS-2179. Como control se emplearon de nuevo las respuestas inducidas por UTP 100  $\mu$ M, las cuales se redujeron un 50%, tal y como se había descrito en trabajos anteriores del grupo (Jimenez y cols., 2000). En la figura 35, se observa que, tanto en presencia como en ausencia del antagonista, el tratamiento sólo inhibe la respuesta de forma parcial, alrededor del 30%, indicando que existe un sinergismo entre varios tipos de proteínas G, sensibles e insensibles a *toxina pertussis*. Este hecho ya se ha observado en otros modelos, por ejemplo, en eritrocitos humanos las respuestas de calcio inducidas por la activación del receptor  $P2Y_2$  están mediadas por proteínas  $G_{\alpha_{16}}$  y  $G_i$ . (Baltensperger y Porzig, 1997). Al detectar, en poblaciones de astrocitos, respuestas de calcio que no parecen deberse a la activación del receptor  $P2Y_1$ , puesto que son insensibles a MRS-2179, decidimos llevar a cabo su caracterización en células individuales con el propósito de conocer la distribución de los receptores de ADP, receptores  $P2Y_1$  y  $P2Y_{13}$ -like, que podrían estar mediando estas respuestas.



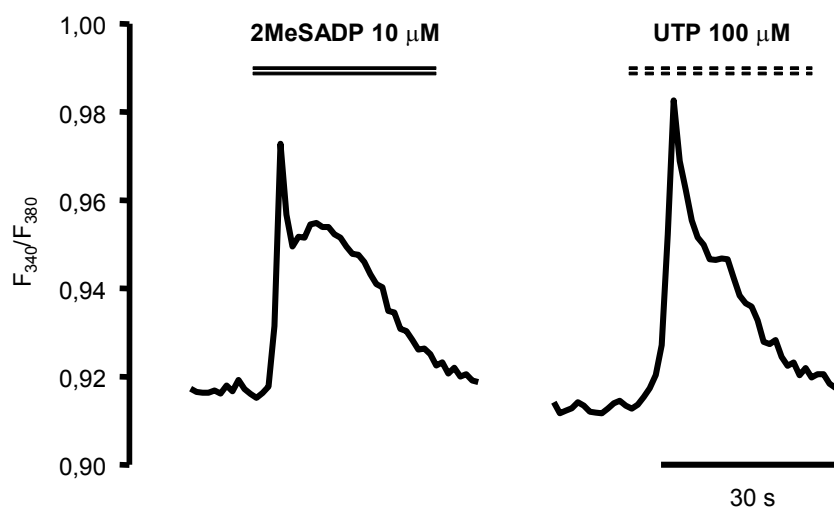
**Figura 34.- Efecto de los antagonistas de los receptores  $P2Y_1$ , MRS-1279, y  $P2Y_{12}$ , 2MeSAMP, sobre las respuestas de calcio inducidas por 2MeSADP en poblaciones de astrocitos.** Las células en suspensión se estimularon con 2MeSADP 10  $\mu$ M. Donde se indica, se llevó a cabo la preincubación durante 3 minutos con MRS-2179 10  $\mu$ M y/o 2MeSAMP 100  $\mu$ M. Los registros A, B, C y D corresponden a un experimento tipo para cada condición. Como control de la respuesta, las células se estimularon con UTP 100  $\mu$ M después de la estimulación con 2MeSADP. En el panel inferior, cada barra corresponde a la media  $\pm$  SEM de al menos cuatro experimentos realizados por triplicado.



**Figura 35.- Efecto de la *toxina pertussis* sobre las respuestas de calcio inducidas por 2MeSADP y UTP.** Las células se pretrataron con 1  $\mu$ g/mL de *toxina pertussis* durante dos horas antes de la estimulación con los agonistas. A y C.- Registros de calcio de poblaciones control de astrocitos. B y D.- Registros de calcio de poblaciones de astrocitos tratadas con *toxina pertussis*. Donde se indica las células se preincubaron 3 minutos con 10  $\mu$ M MRS-2179. El gráfico inferior corresponde a la media  $\pm$  SEM de tres experimentos realizados en duplicado.

### 1.3.2.- Caracterización de las respuestas de calcio inducidas por 2MeSADP en astrocitos individuales.

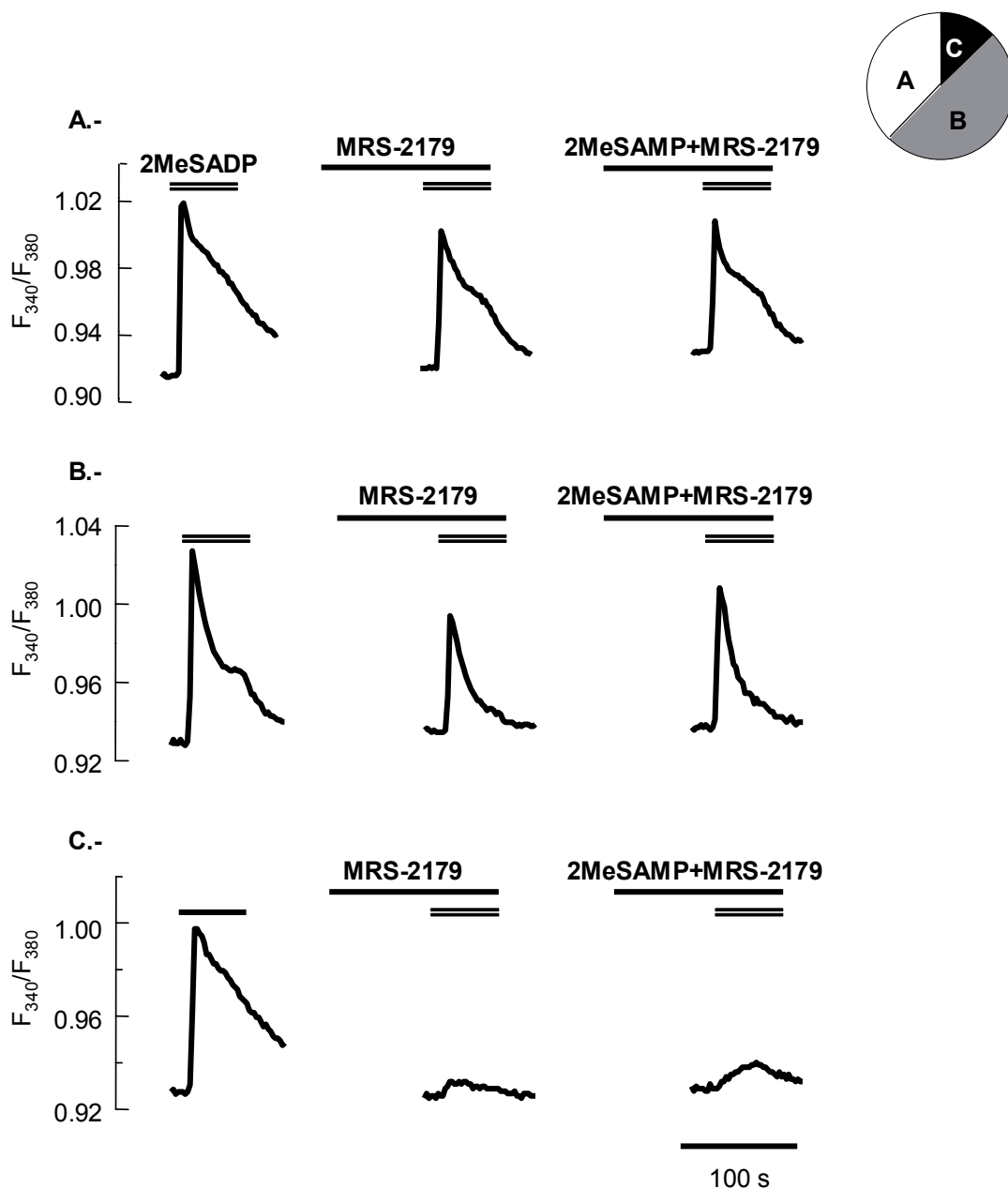
El estudio de las respuestas de calcio en células individuales se realizó mediante ensayos microfluorimétricos con la sonda fura-2 en un microscopio acoplado a un sistema de video-imagen. Como era de esperar, todas las células ensayadas respondieron a estimulaciones con 10  $\mu$ M 2MeSADP con señales intracelulares de calcio similares a las inducidas por UTP en las mismas condiciones experimentales (figura 36). Los incrementos de fluorescencia, representados como el cociente de  $F_{340}/F_{380}$ , variaron de una células a otras entre 0,022 y 0,088 ( $0,051 \pm 0,002$ ,  $n = 224$  células).



**Figura 36.- Respuestas de calcio inducidas por 2MeSADP y UTP en células individuales.**

Los astrocitos, cargados con la sonda Fura-2, se estimularon durante 30 s con 2MeSADP 10  $\mu$ M o UTP 100  $\mu$ M. En la figura se muestra una respuesta tipo a ambos agonistas de una misma célula.

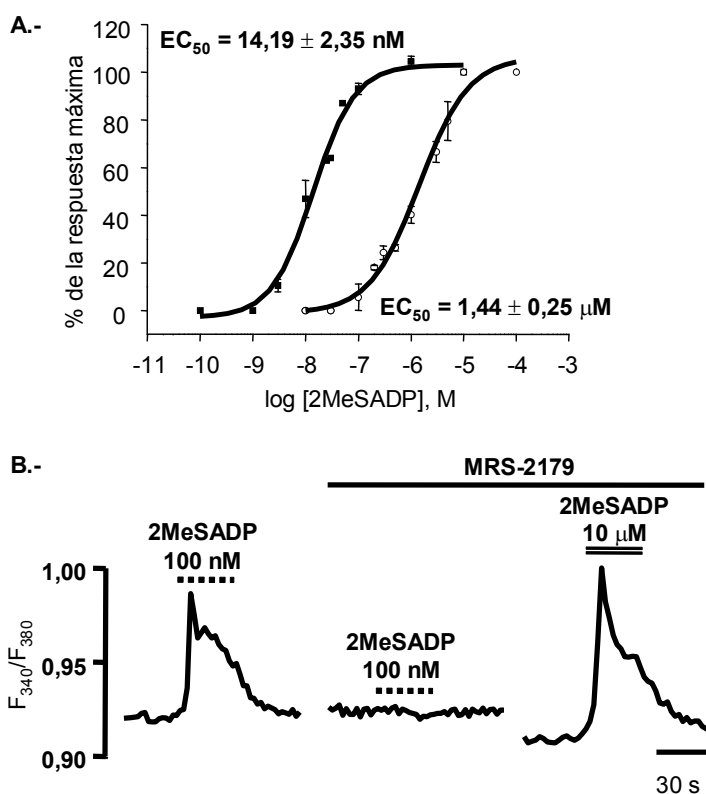
No todas las células presentaron la misma sensibilidad a MRS-2179. Como se muestra en la figura 37, pudimos distinguir tres poblaciones. El 38% de las células eran prácticamente insensibles a la incubación con el antagonista, siendo en algunos casos la respuesta en presencia del MRS-2179 mayor a la registrada en ausencia del mismo, el 49% mostraba una magnitud de respuesta entre el 30% y el 70% de la respuesta observada sin preincubar con el antagonista, y solamente en el 13% de las células la movilización de calcio intracelular se bloqueaba por completo. Cuando se realizaron estudios similares, en presencia de MRS-2179 y 2MeSAMP, se obtuvo el mismo patrón de respuesta. Estos datos indican que las señales de calcio inducidas por 2MeSADP deben estar mediados por dos receptores, el receptor  $P2Y_1$ , sensible a MRS-2179, y otro receptor diferente, probablemente el receptor  $P2Y_{13}$ -like.



**Figura 37.- Efecto de los antagonistas MRS-2179 y 2MeSAMP sobre las respuestas de calcio inducidas por 2MeSADP en astrocitos individuales.** Las células cargadas con Fura-2, se estimularon con 2MeSADP 10  $\mu$ M durante 30 segundos. Donde se indica se llevó a cabo la preincubación durante 3 minutos con 10  $\mu$ M MRS-2179 en ausencia o presencia de 100  $\mu$ M 2MeSAMP. La figura muestra registros de tres células representativas de las subpoblaciones encontradas en función de la sensibilidad a la inhibición por MRS-2179. Los porcentajes de cada una de las subpoblaciones se representan en el diagrama circular.

Con el fin de poder discriminar entre los dos receptores y conocer el umbral de activación de cada uno de ellos, realizamos una curva dosis-respuesta para 2MeSADP en ausencia y presencia de MRS-2179 (figura 38A). Los valores de  $EC_{50}$  obtenidos fueron 14,19

$\pm 2,35$  nM y  $1,44 \pm 0,25$   $\mu$ M, respectivamente. Como se muestra en la figura, en ausencia del antagonista, el efecto máximo se alcanzó con 2MeSADP 1  $\mu$ M. Ahora bien, analizando las curvas dosis-respuestas más detalladamente, se observa que a 100 nM se obtuvo prácticamente la respuesta máxima y que la movilización de calcio en dichas condiciones era completamente sensible a MRS-2179. Estos resultados sugieren que el receptor responsable de las respuestas inducidas por 100 nM 2MeSADP es el receptor P2Y<sub>1</sub>, mientras que a concentraciones más elevadas se estaría activando otro receptor, cuyo umbral de activación es mucho más alto, con un valor de EC<sub>50</sub> 100 veces mayor. En la figura 38B, se muestra un ejemplo de la movilización de calcio inducida por 100 nM 2MeSADP y como se bloquea completamente por la preincubación con MRS-2179, mientras que dicho tratamiento no afecta a las respuestas inducidas por 10  $\mu$ M de agonista.

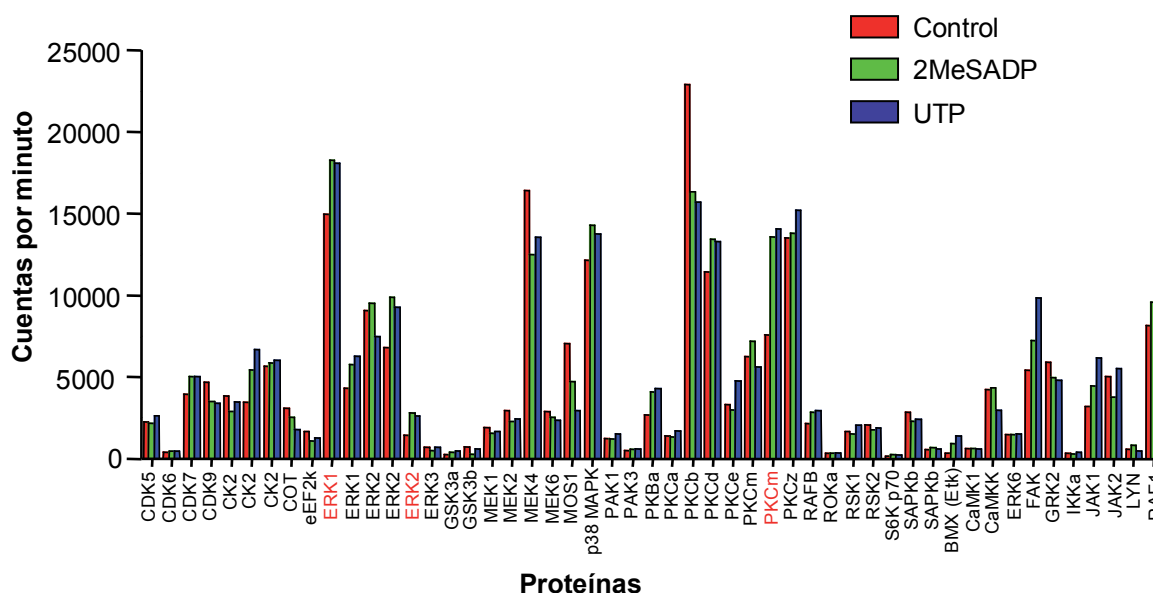


**Figura 38.- A.- Curvas dosis respuesta de 2MeSADP en presencia o ausencia de MRS-2179.** Las células se preincubaron en presencia (○) o ausencia (■) de MRS-2179 10  $\mu$ M durante 3 minutos, antes de la estimulación con diferentes concentraciones del agonista 2MeSADP. Los porcentajes de respuesta se calcularon respecto a la respuesta máxima de calcio obtenida con 2MeSADP 10  $\mu$ M en presencia o ausencia del antagonista. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de aproximadamente 100 células para cada condición. **B.- Efecto del MRS-2179 sobre las respuestas inducidas por 2MeSADP.** Los registros son representativos de las respuestas registradas al estimular las células con 100 nM 2MeSADP en ausencia o presencia de MRS-2179, así como de la movilización de calcio observada cuando, a continuación, los astrocitos se estimularon con 10  $\mu$ M de agonista.



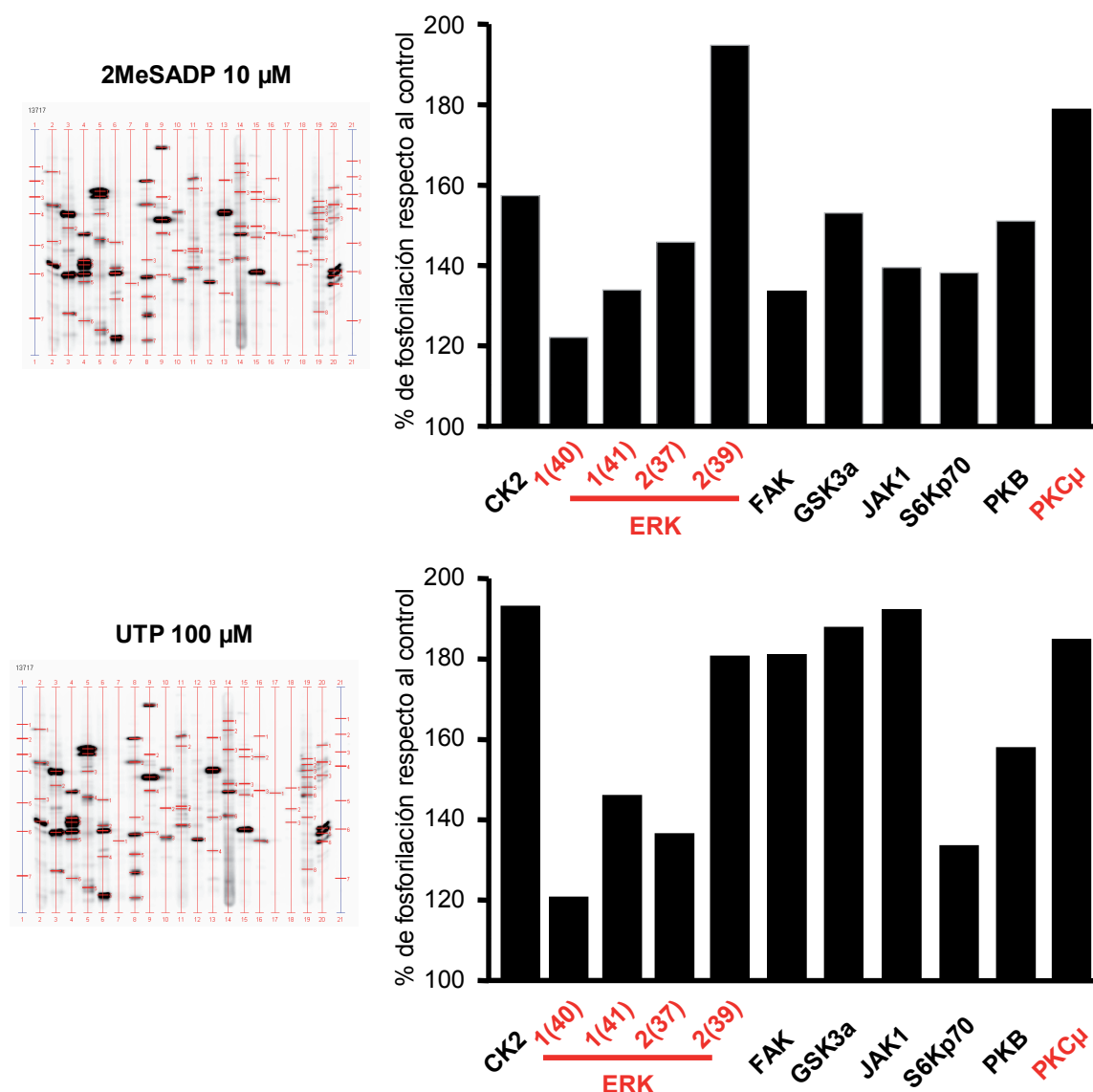
#### 1.4.- Exploración de la fosforilación mediada por nucleótidos de distintas proteínas intracelulares.

Con el objetivo de profundizar en la señalización de los receptores de ADP presentes en los astrocitos de rata, decidimos analizar la activación inducida por 2MeSADP de una serie de proteínas claves en señalización y compararla con el efecto del UTP. Para ello se enviaron extractos de células estimuladas con estos compuestos, junto con un extracto control sin estimular, a la empresa Kinexus Bioinformatics Corporation. Esta empresa realiza ensayos de fosforilación utilizando un sistema de exploración de proteínas fosforiladas, denominado Kinetworks™, basado en la técnica de inmunotransferencia. Como se muestra en la figura 39, la estimulación con ambos agonistas indujo cambios en el estado de fosforilación de varias de las proteínas testadas.



**Figura 39.- Exploración de la fosforilación de proteínas inducida por ATP y UTP.** Las células se estimularon durante cinco minutos con 10  $\mu$ M 2MeSADP o UTP 100  $\mu$ M. Los extractos se recogieron siguiendo las instrucciones dadas por los laboratorios Kinexus Bioinformatics Corporation donde se realizaron los estudios de fosforilación. La figura muestra el diagrama de barras proporcionados por Kinexus. En él se comparan los niveles de fosforilación obtenidos en las muestras control y estimuladas con 2MeSADP o UTP. La cuantificación de las bandas se realiza en unidades de intensidad por mm en un tiempo de medida de 60 segundos (CPM) normalizados en función de la cantidad de proteína de cada muestra. En rojo se indican las variaciones de las proteínas en las que se centraron los estudios posteriores, PKCm (actualmente denominada PKD) y ERK1/2. De las diferentes isoformas se han marcado aquellas que por su peso molecular coinciden con las detectadas por los anticuerpos que han sido utilizados en nuestro laboratorio.

Entre las enzimas cuyo grado de fosforilación más se incrementó se encuentran proteínas implicadas en apoptosis, supervivencia, proliferación y migración, por ejemplo, GSK3 (Glucogeno sintasa quinasa 3), PKB (Proteína quinasa B), las proteínas ERKs (quinasas reguladas extracelularmente) o FAK (Quinasa de adhesión focal), figura 40.

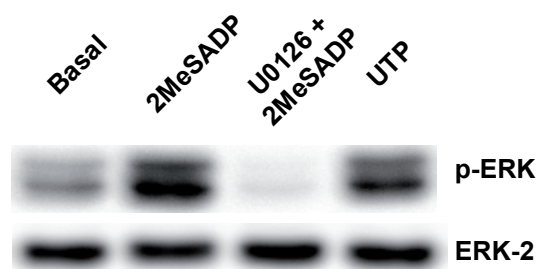


**Figura 40.- Efecto de 2MeSADP y UTP sobre la fosforilación de distintas proteínas intracelulares.** Se muestra uno de los geles proporcionados por Kinexus para cada agonista. Cada uno de ellos consta de 21 calles, en cada una de las cuales se detectan varias proteínas. Los diagramas de la derecha muestran los incrementos en los niveles de fosforilación de aquellas proteínas donde se produce más variación respecto al control. Según las instrucciones de Kinexus, el efecto es significativo si la diferencia es superior al 25%.

### **1.5.- Activación de la proteína ERK inducida por la estimulación con 2MeSADP en astrocitos de cerebelo.**

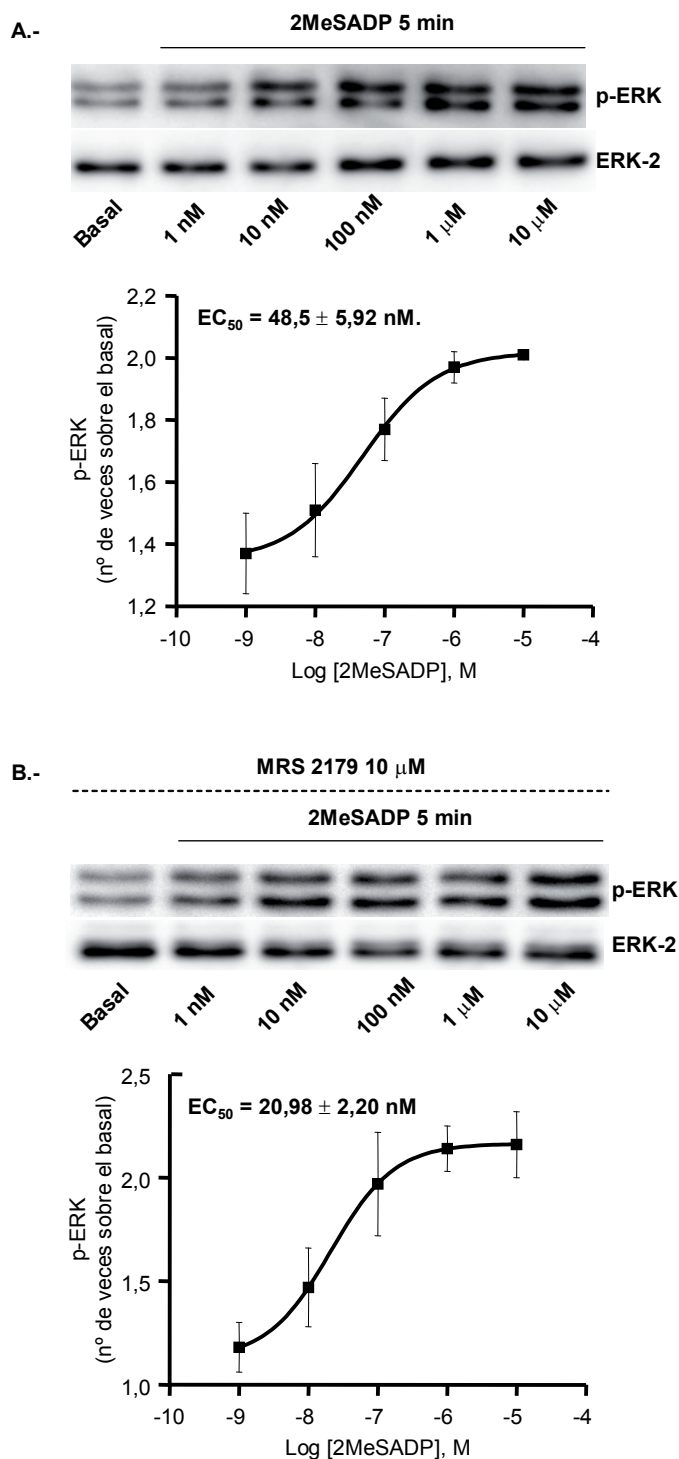
Como se ha mostrado en el apartado anterior, el 2MeSADP y el UTP inducían un incremento considerable de la fosforilación de las proteínas ERKs. Por tanto, decidimos centrarnos en el estudio de esta cascada de señalización, cuya activación por los tres receptores de ADP ha sido descrita en varios tipos celulares con diferentes efectos fisiológicos (Sellers y cols., 2001; Grobбен y cols., 2001; Communi y cols., 2001b; Mamedova y cols., 2006).

Para determinar el efecto de los nucleótidos sobre las proteínas ERKs, llevamos a cabo experimentos de inmunotransferencia con anticuerpos que reconocen la forma fosforilada y no fosforilada de dichas proteínas. La estimulación de las células con 2MeSADP produce un incremento de la forma fosforilada de ERK1/2, inferior al inducido por UTP, que se abolió al tratar a los astrocitos con inhibidores de las quinasas responsables de la activación de estas enzimas, las proteínas MEKs (figura 41).



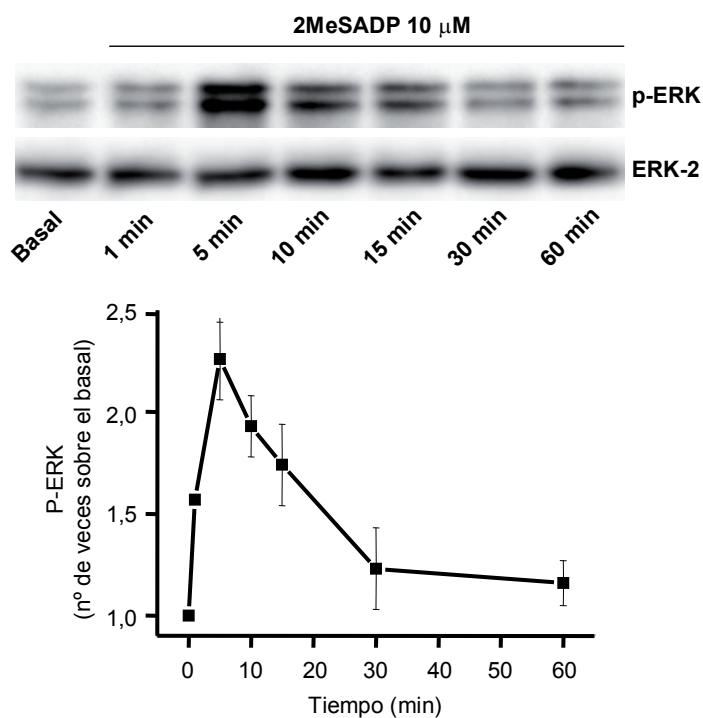
**Figura 41.- Fosforilación de la proteína ERK inducida por 10  $\mu$ M 2MeSADP.** La figura muestra un experimento tipo, realizado con extractos obtenidos de astrocitos estimulados con 10  $\mu$ M 2MeSADP o 100  $\mu$ M UTP durante cinco minutos. Donde se indica se llevó a cabo la preincubación durante 30 minutos con 10  $\mu$ M U-0126.

La respuesta a 2MeSADP era dosis dependiente con un valor de  $EC_{50}$  de  $48,5 \pm 5,92$  nM. El nivel máximo de fosforilación se alcanzó a una concentración de 1  $\mu$ M, aunque el efecto observado a 1-10 nM ya era bastante elevado (figura 42A). Estos resultados son muy similares a los calculados para la inhibición de la adenilato ciclasa inducida por 2MeSADP. Con el objetivo de determinar que receptor era el responsable de esta respuesta, realizamos el mismo experimento en presencia del antagonista del receptor  $P2Y_1$ , MRS-2179. Como se observa en la figura 42B, la curva dosis respuesta era muy similar a la obtenida en ausencia del antagonista, con un valor de  $EC_{50}$  de  $20,98 \pm 2,20$  nM, lo que parece descartar la participación del receptor  $P2Y_1$ .



**Figura 42.-** Curvas dosis respuesta de la fosforilación de las proteínas ERKs inducida por 2MeSADP en presencia y ausencia de MRS-2179. **A.-** Los astrocitos se estimularon durante cinco minutos con diferentes concentraciones de 2MeSADP. **B.-** Las células se preincubaron durante tres minutos con MRS-2179 10  $\mu$ M antes de llevar a cabo la estimulación con el agonista. Las gráficas inferiores muestran la media  $\pm$  SEM de tres experimentos realizados con cultivos diferentes.

Como se observa en la figura 43, la fosforilación inducida por 2MeSADP 10  $\mu$ M fue transitoria. El máximo efecto se produjo a los cinco minutos de estimulación, recuperándose los niveles basales a la hora de incubación. Estos resultados coinciden con los descritos para el receptor P2Y<sub>13</sub> (Communi y cols., 2001b).

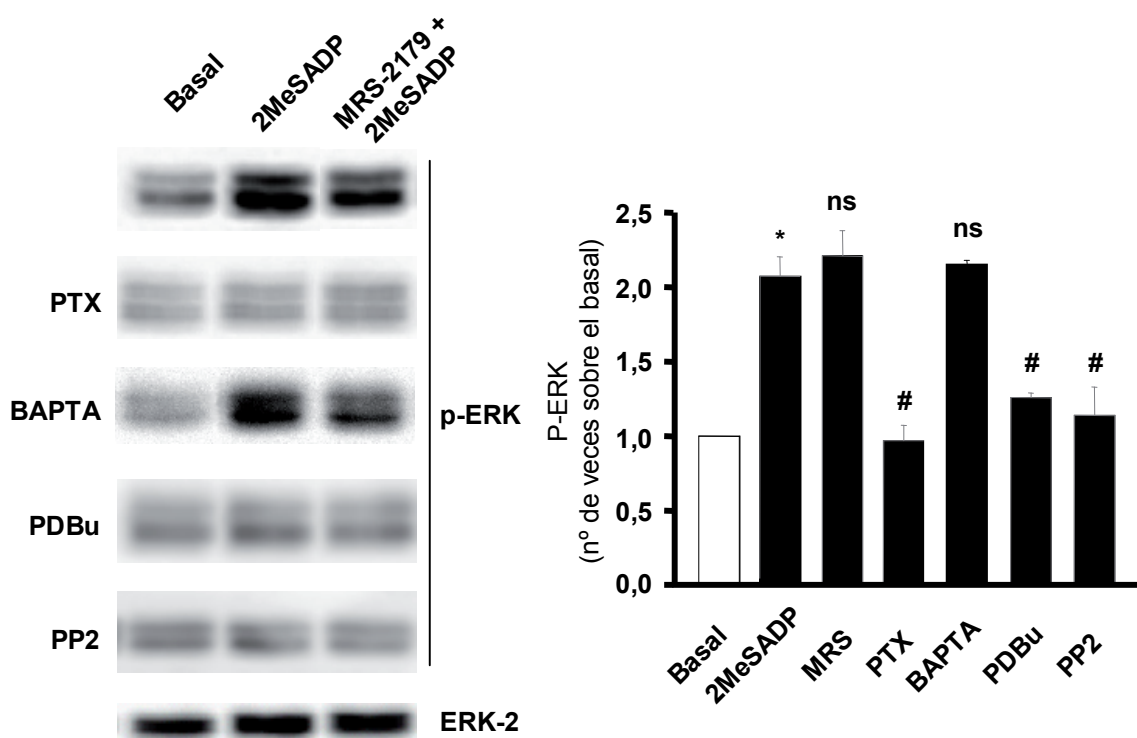


**Figura 43.- Fosforilación de la proteína ERK inducida por 2MeSADP a diferentes tiempos.**

Los astrocitos se estimularon con 10  $\mu$ M 2MeSADP durante diferentes tiempos. El panel superior muestra un experimento tipo. La gráfica inferior corresponde a la media  $\pm$  SEM de cuatro experimentos realizados con cultivos diferentes.

Con el objetivo de identificar el mecanismo por el cual 2MeSADP induce la activación de las ERKs, estudiamos el efecto de diferentes tratamientos sobre las respuestas inducidas por este agonista a concentración 10  $\mu$ M. Como se observa en la figura 44, la presencia o ausencia de MRS-2179 no afectó a la fosforilación de estas proteínas en ninguno de los tratamientos testado. En la misma figura, se muestra como la respuesta se bloqueó por el tratamiento con *toxina pertussis*, indicando que en la respuesta está implicada una proteína G<sub>i/o</sub>. Este resultado, de nuevo, parece indicar que el receptor responsable de la respuesta es el receptor P2Y<sub>13</sub>-like, ya que los trabajos de otros grupos confirman que, tanto el receptor P2Y<sub>12</sub> como el receptor P2Y<sub>13</sub>, activan la cascada de las MAPKs a través de proteínas G<sub>i/o</sub> (Grobber y cols., 2001; Communi y cols., 2001b), mientras que en el caso del receptor P2Y<sub>1</sub> la activación de las ERKs está mediada por proteínas insensibles a *toxina pertussis* (Sellers y cols., 2001). En la misma figura, se muestra como la respuesta inducida por 2MeSADP

no se modificó al quelar el calcio intracelular con BAPTA-AM. Este compuesto es capaz de atravesar la membrana plasmática y, una vez en el interior celular, es hidrolizado por esterasas. De esta forma, queda confinado en el citoplasma, donde se une al calcio intracelular. Por el contrario, la fosforilación de las proteínas ERKs inducida por 2MeSADP fue bloqueada por el tratamiento prolongado con esteres de forbol, sugiriendo la participación de PKCs reguladas por DAG, y por el inhibidor de las proteínas Src, PP2 (Karni y cols., 2003).



**Figura 44.- Efecto de diferentes tratamientos sobre la fosforilación de la proteína ERK inducida por 2MeSADP en astrocitos tipo 1.** Antes de la estimulación con 10  $\mu$ M 2MeSADP, las células se preincubaron con los compuestos indicados: MRS-2179 10  $\mu$ M durante 3 minutos, *toxina pertussis* 100 ng/mL o PDBu 200 nM durante 18 horas o PP2 10  $\mu$ M durante 30 minutos. En el panel superior se muestra un experimento tipo de cada condición. La grafica inferior corresponde a la media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos obtenidos para las estimulaciones con 2MeSADP en ausencia de MRS-2179. La gráfica obtenida en presencia del antagonista, no difiere significativamente de la aquí representada. \* comparación entre el basal y la respuesta a 2MeSADP. #, ns comparación entre los diferentes tratamientos y el efecto de 2MeSADP.

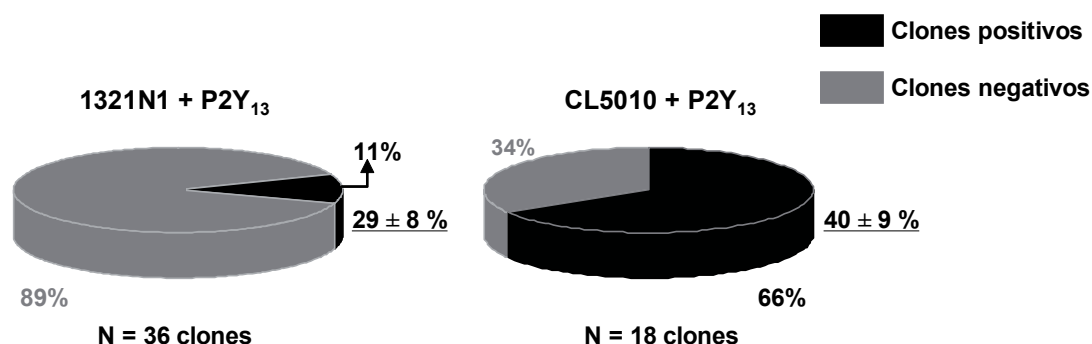
Los resultados anteriores parecen indicar que los astrocitos de cerebelo de rata coexpresan dos receptores de ADP, el receptor P2Y<sub>1</sub> y el receptor P2Y<sub>13</sub>-like. El primero de ellos estaría acoplado a la movilización de calcio a bajas concentraciones de agonista, mientras que la activación del receptor P2Y<sub>13</sub> induciría la inhibición de la adenilato ciclasa, la movilización de calcio intracelular a altas concentraciones y la activación de la cascada de las MAP quinasas.

### 1.6.- Expresión de los receptores P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>13</sub> en células de astrocitoma 1321N1.

Con el proposito de profundizar en la señalización mediada por los receptores P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>13</sub> decidimos expresarlos de manera estable en células de astrocitoma 1321N1. Esta línea celular ha sido ampliamente utilizada en el estudio de receptores purinérgicos, ya que no expresa ningún tipo de receptor de nucleótidos de manera endógena y posee toda la maquinaria necesaria para la transducción de señales utilizada por estos receptores.

A partir de cDNA de células sanguíneas humanas se obtuvo el DNA que codifica para el receptor P2Y<sub>13</sub>. Posteriormente esta secuencia se clonó en el plásmido pZeoSV, que posee un gen de resistencia a zeocina, como se describe en el apartado de Métodos y se llevó a cabo la transformación de bacterias competentes *E. Coli TOP10F*. Una vez obtenido el plásmido con el inserto de la secuencia del receptor P2Y<sub>13</sub> se transfectaron las células de astrocitoma 1321N1, así como una línea derivada de ésta, denominada CL5010, que expresaba de manera estable el receptor P2Y<sub>1</sub>.

La selección de los clones que expresaban los receptores funcionales se realizó mediante medidas de AMPc utilizando un kit radiactivo que emplea <sup>125</sup>I. Los resultados se muestran en la figura 45, donde se observa que el número de clones positivos obtenidos en las células que expresaban los dos subtipos de receptores era mas elevado que en aquellas células que solo expresaban el receptor P2Y<sub>13</sub>. Por otro lado, el porcentaje de inhibición, un 40% aproximadamente, fue mayor en el primer caso y no se modificó por la preincubación con MRS-2179 10 µM, tal y como ocurría en los experimentos de medida de AMPc realizados en astrocitos descritos en el apartado 1.2 del capítulo de Resultados.



**Figura 45.- Inhibición de la producción de AMPc inducida por 2MeSADP 10 µM en células de astrocitoma transfectadas con el receptor P2Y<sub>13</sub> (1321N1) o con los receptores P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>13</sub> (CL5010).** Las células se estimularon con Forskolina 10 µM o se coestimularon con este activador de la adenilato ciclasa y 2MeSADP 10 µM durante 5 minutos. Los experimentos se realizaron en presencia del inhibidor de fosfodiesterasas IBMX 100 µM. La medida de AMPc de los extractos celulares obtenidos se llevó a cabo con un kit comercial que emplea <sup>125</sup>I. Los valores en negro corresponden al porcentaje de clones en los que se observó una disminución en la producción de AMPc al coestimular con Forskolina y 2MeSADP. En gris aparecen los porcentajes de clones en los que no se detectó variación. El valor subrayado indica la media ± SEM de los porcentajes de inhibición inducida por 2MeSADP en los clones positivos.



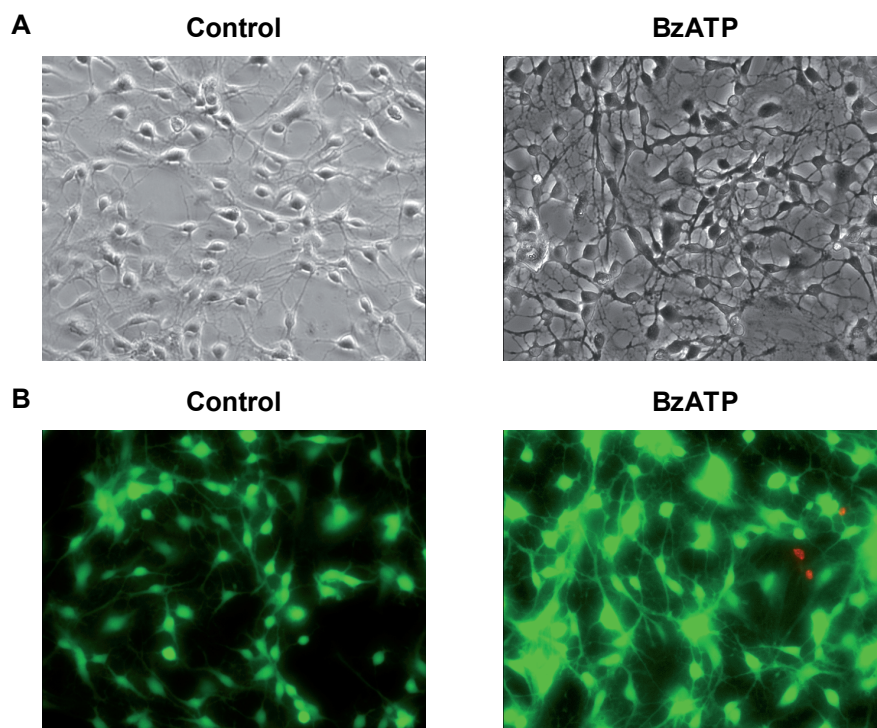
## 2.- CARACTERIZACIÓN DEL RECEPTOR DIANA DE BZATP EN ASTROCITOS DE CEREBELO DE RATA Y SUS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR.

Aunque en principio el receptor P2X<sub>7</sub> fue identificado como el antiguo receptor P2Z citolítico característico y exclusivo de macrófagos y otras células del sistema inmune, como células dendríticas y microglía (Surprenant y cols., 1996), recientemente se ha descrito en otros tipos celulares, incluidas neuronas y astrocitos, donde lejos de inducir muerte celular podría participar en procesos de neuroprotección y neurotransmisión (Deuchars y cols., 2001; Panenka y cols., 2001; Kukley y cols., 2001; Hervas y cols., 2003; Fellin y cols., 2006; Anderson y Nedergaard, 2006). Por ello, decidimos estudiar su presencia y posible función en nuestro modelo celular.

En trabajos anteriores, se había demostrado que los astrocitos de cerebelo de rata únicamente expresaban receptores metabotrópicos de ATP, receptores P2Y<sub>2</sub>/P2Y<sub>4</sub>, ya que en ausencia de calcio extracelular ATP y UTP inducían respuestas idénticas a las observadas cuando dicho ión estaba presente en el medio extracelular. Además, los astrocitos eran insensibles a estimulaciones con  $\alpha,\beta$ -meATP, agonista selectivo de los receptores ionotrópicos tipo P2X<sub>1</sub> y P2X<sub>3</sub>. Sin embargo, estos estudios no excluían la presencia del receptor P2X<sub>7</sub> que, al tratarse de un receptor de baja afinidad para ATP, requiere para su activación concentraciones de rango mM, que no se habían ensayado. Estos resultados contrastan con los que se han obtenido en astrocitos de otras zonas de cerebro, tales como corteza, hipocampo y *nucleus accumbens*, en los cuales se coexpresan receptores de nucleótidos tanto ionotrópicos como metabotrópicos (King y cols., 1996; Kukley y cols., 2001; Fumagalli y cols., 2003; Fellin y cols., 2006).

En primer lugar y con el propósito de analizar la presencia del receptor P2X<sub>7</sub> en los astrocitos de cerebelo, las células se estimularon durante una hora con un potente agonista de este receptor, el BzATP (North, 2002), y se chequeó la viabilidad celular (figura 46). Mediante estos ensayos se comprobó que la estimulación prolongada con BzATP, lejos de inducir la lisis celular, producía una serie de cambios morfológicos que no se reproducían con ningún otro nucleótido. Por tanto, el BzATP estaría interaccionando con otro receptor, siendo el candidato más idóneo el receptor P2X<sub>7</sub>. El BzATP se ha utilizado ampliamente como agonista específico del receptor P2X<sub>7</sub>, ya que es mucho mas potente que el ATP, sin tener en cuenta que no es totalmente selectivo para este subtipo de receptor (Bianchi y cols., 1999). El BzATP también puede activar otros receptores de nucleótidos ionotrópicos y metabotrópicos. Así, este nucleótido tiene como diana a las subunidades P2X<sub>1</sub> y P2X<sub>3</sub>, a las que se une con la misma afinidad que al receptor P2X<sub>7</sub> (nM), y al receptor P2Y<sub>11</sub>. Estas interacciones están totalmente descartadas en nuestro modelo celular (Jimenez y cols., 2000). La presencia de subunidades P2X<sub>1</sub> y P2X<sub>3</sub>, al menos funcionales, quedó excluida al no observarse respuestas ionotrópicas a  $\alpha,\beta$ -meATP. Asimismo, tampoco se detectó la expresión del receptor P2Y<sub>11</sub>. A partir de estos datos, se podría pensar que las acciones de BzATP están mediadas por un receptor P2X<sub>7</sub>-like, cuya activación no induce lisis celular.





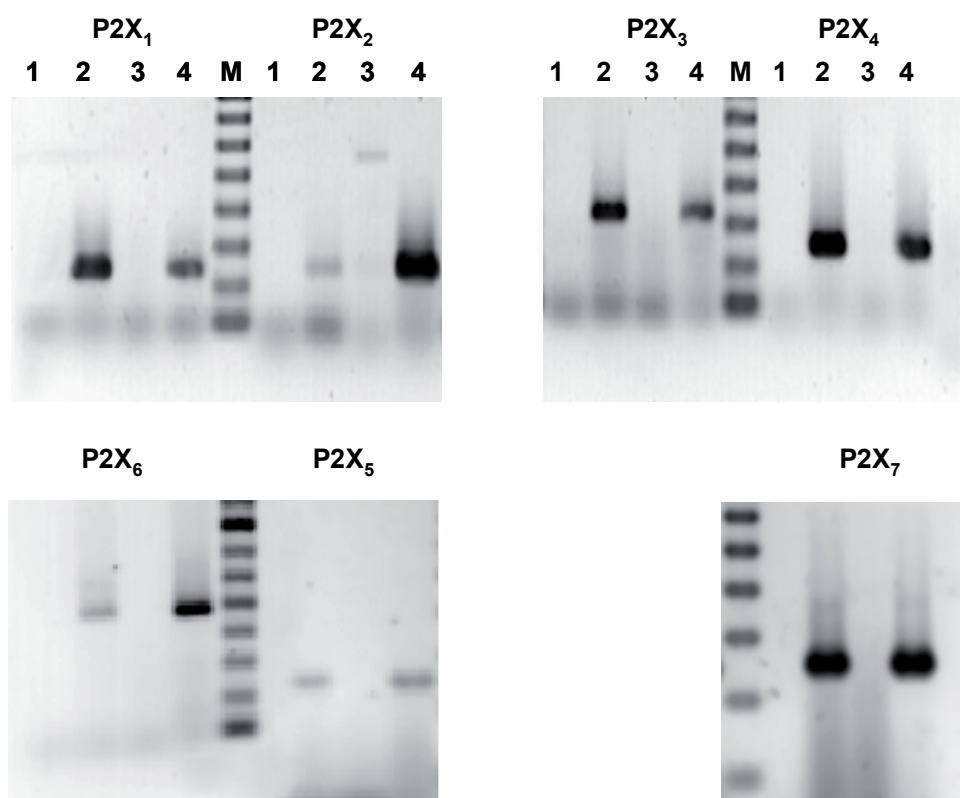
**Figura 46.- BzATP induce cambios morfológicos en los astrocitos de cerebelo.** Las células se incubaron durante 1 hora con BzATP 100  $\mu$ M. A continuación, se adicionó una mezcla de calceína/homodímero-1 de etidio que nos permitió distinguir las células viables de las que no lo eran. **A.-** Imagen en contraste de fase de los astrocitos antes (control) y después de la incubación (BzATP). **B.-** Fluorescencia emitida por las células vivas (verde) y muertas (rojas) antes y después del tratamiento.

### **2.1.- Identificación de las subunidades P2X en astrocitos de cerebelo tipo1.**

Como se ha comentado en la Introducción, todos los estudios de coexpresión heteróloga de las diferentes subunidades P2X pusieron de manifiesto que las subunidades P2X<sub>7</sub> no coensamblaban con ningún otro subtipo, por ello durante mucho tiempo se pensó que los receptores P2X<sub>7</sub> endógenos eran receptores homoméricos. Sin embargo, se ha comprobado que todos los tejidos que poseen receptores P2X<sub>7</sub> funcionales, incluidos macrófagos y microglía, también expresan subunidades P2X<sub>4</sub>, a las que todavía no se les ha asignado ninguna función. Este hecho ha llevado a proponer recientemente que tal vez exista un coensamblaje o una interacción entre las subunidades P2X<sub>4</sub> y P2X<sub>7</sub> (Guo y cols., 2007) formando un receptor funcional que, al igual que el receptor homomérico P2X<sub>7</sub>, se activaría preferencialmente por BzATP.

Con el propósito de determinar que receptor estaba mediando las acciones tróficas de BzATP, decidimos analizar qué subunidades P2X se expresaban en los astrocitos de cerebelo. Para ello, se llevó a cabo la detección del RNAm de los diferentes subtipos mediante experimentos de RT-PCR a partir de RNA obtenido de diferentes cultivos tal y

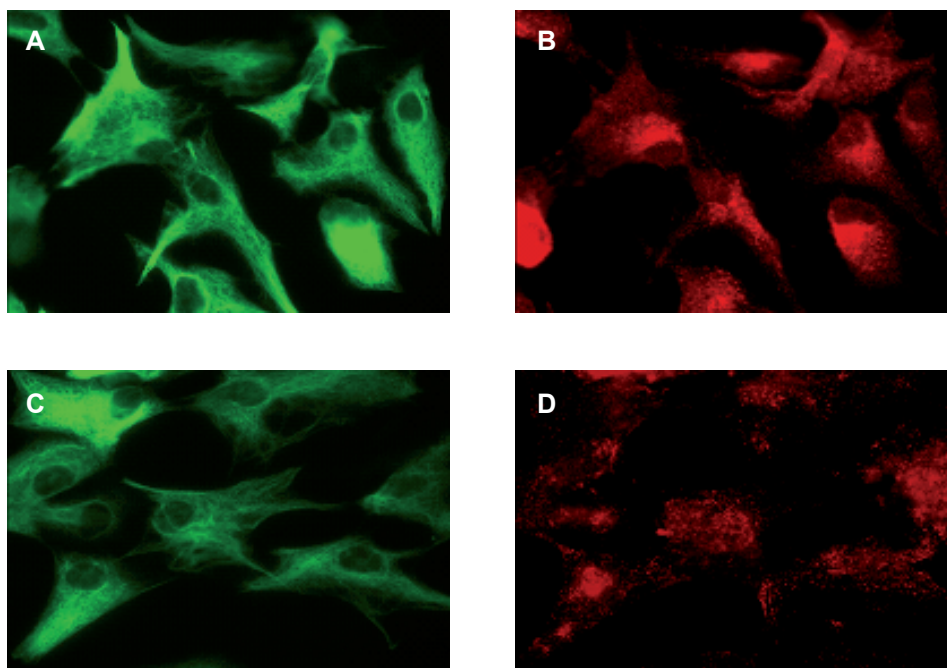
como se describe en Métodos. Como se muestra en la figura 47, se detectaron niveles altos de expresión del RNAm para las subunidades P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub> y P2X<sub>7</sub>, mientras que apenas se obtuvo señal para las subunidades P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>5</sub> y P2X<sub>6</sub>. La ausencia de la subunidad P2X<sub>5</sub> no es sorprendente, ya que esta subunidad no se expresa en cerebelo. La falta de mensajero de las subunidades P2X<sub>2</sub> y P2X<sub>6</sub>, concuerda los resultados obtenidos previamente, ya que en los astrocitos de cerebelo de rata no se observaron respuestas ionotrópicas a ATP 100  $\mu$ M (Jimenez y cols., 2000), al contrario de lo que ocurre en neuronas de Purkinje y neuronas granulares de cerebelo (Garcia-Lecea y cols., 1999 2003), donde estas subunidades son muy abundantes.



**Figura 47.- Detección del mRNA de las diferentes subunidades P2X en astrocitos tipo 1.** Los productos de PCR para cada receptor se separaron en geles de agarosa al 2% (calle 2 de cada gel). Como control de expresión se utilizó RNA total obtenido de cerebelo completo (calle 4). Para cada receptor se realizó un control con agua en vez de cDNA (calle 1) y en ausencia de RT (calle 3). El tamaño de las bandas se determinó usando como patrones de RNA una escalera de 100 pb.

La presencia de las subunidades P2X también se estudió a través de experimentos de inmunocitoquímica, mediante los cuales solamente se detectaron las proteínas de las subunidades P2X<sub>4</sub> y P2X<sub>7</sub>, sin obtenerse ningún tipo de marcaje con los anticuerpos que reconocen a las subunidades P2X<sub>1</sub> y P2X<sub>3</sub> y que habían sido probados, con resultados

positivos, en otros modelos celulares empleados en nuestro laboratorio, por ejemplo en neuronas granulares de cerebelo (Hervas y cols., 2003). Como se puede apreciar en la figura 48, la distribución del marcaje obtenido para las subunidades  $P2X_4$  y  $P2X_7$  es bastante diferente, las subunidades  $P2X_4$  colocalizan con la distribución de la proteína GFAP, mientras que el marcaje obtenido con el anticuerpo frente a las subunidades  $P2X_7$  es punteado y aparece distribuido por toda la membrana. Un marcaje similar para ambas subunidades ha sido descrito en macrófagos alveolares de rata, en astrocitos de corteza o en células HEK-293, donde dicho receptor ha sido expresado de forma heteróloga (Panenka y cols., 2001; Bowler y cols., 2003; Amstrup y Novak, 2003). También se detectó la expresión del receptor en el núcleo igual que ocurre en neuronas hipocámpales (Atkinson y cols., 2002). En muchos casos la expresión de mRNA no se correlaciona con la presencia de la proteína, como ocurre en esta ocasión con las subunidades  $P2X_1$  y las subunidades  $P2X_3$ . La ausencia de estas dos subunidades corrobora los ensayos funcionales, ya que en los astrocitos de cerebelo no se detectaron respuestas de calcio al estimularlos con  $\alpha,\beta$ -meATP (Jimenez y cols., 2000).



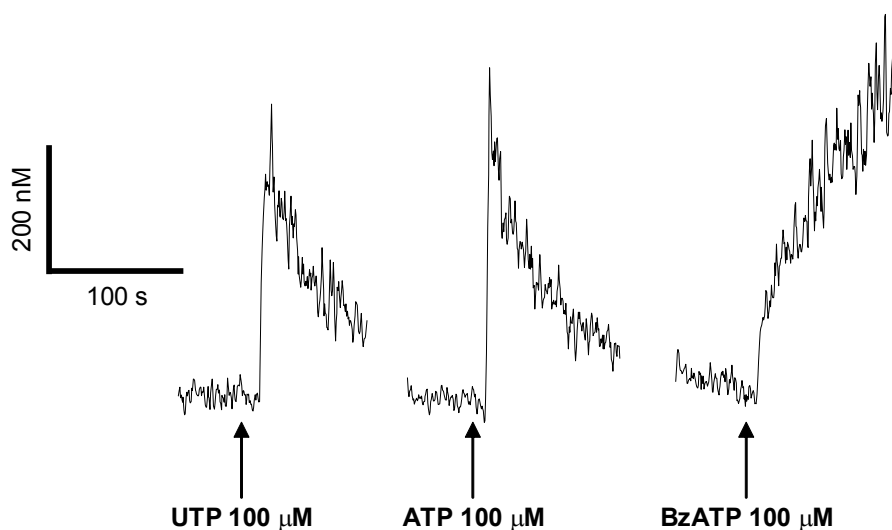
**Figura 48.- Detección inmunocitoquímica de las subunidades  $P2X_4$  y  $P2X_7$  en astrocitos de cerebelo.** Las células se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4%. Posteriormente, se llevó a cabo la identificación celular con anticuerpos específicos. **A y C.** Marcaje positivo con el anticuerpo frente a GFAP (1:200) revelado con FITC (1:500). **B.** Marcaje con el anticuerpo frente a la subunidad  $P2X_4$  (1:100). **D.** Marcaje con el anticuerpo frente a la subunidad  $P2X_7$  (1:100). También se emplearon anticuerpos frente a las subunidades  $P2X_1$  y  $P2X_3$ , ambas a una dilución 1:100. En ningún de los dos casos se obtuvo marcaje. Todas las subunidades se revelaron con  $Cy^3$  (1:400).

## **2.2.- Caracterización de las respuestas de calcio inducidas por BzATP en astrocitos de cerebello.**

El receptor  $P2X_7$  es un receptor ionotrópico cuya estimulación produce la entrada de calcio extracelular. Por ello, con el objetivo de estudiar la funcionalidad de las subunidades  $P2X_7$  detectadas por inmunocitoquímica, se analizaron las señales de calcio intracelulares inducidas por BzATP.

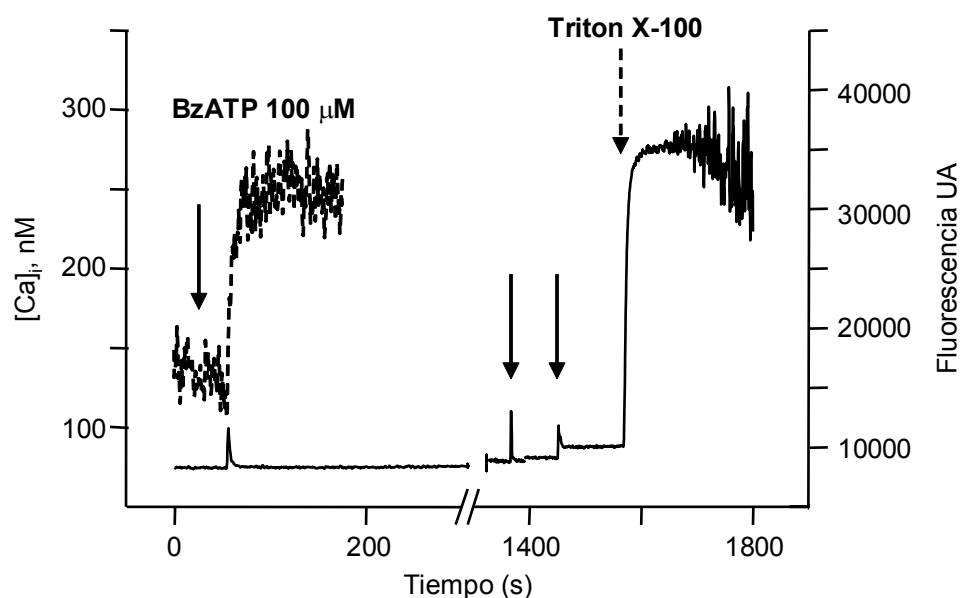
### **2.2.1.- Análisis de las respuestas de calcio inducidas por BzATP en poblaciones de astrocitos tipo 1.**

Como se muestra en la figura 49, la estimulación de las células con 100  $\mu$ M de BzATP indujo señales intracelulares de calcio con una cinética que difiere de la inducida por otros nucleótidos. Las respuestas obtenidas al estimular los astrocitos con UTP o ATP eran transitorias, recuperándose los niveles basales de calcio durante el primer minuto de estimulación. Por el contrario, la respuesta inducida por BzATP, no sólo no decaía en presencia del agonista si no que iba aumentando con el tiempo. El receptor  $P2X_7$  es un receptor que no se desensibiliza en presencia del agonista, al contrario, las corrientes mediadas por este receptor se mantienen durante varios minutos, y aplicaciones largas del agonista inducen un aumento en la permeabilidad, acompañadas de un incremento en la amplitud de la corriente (North, 2002).



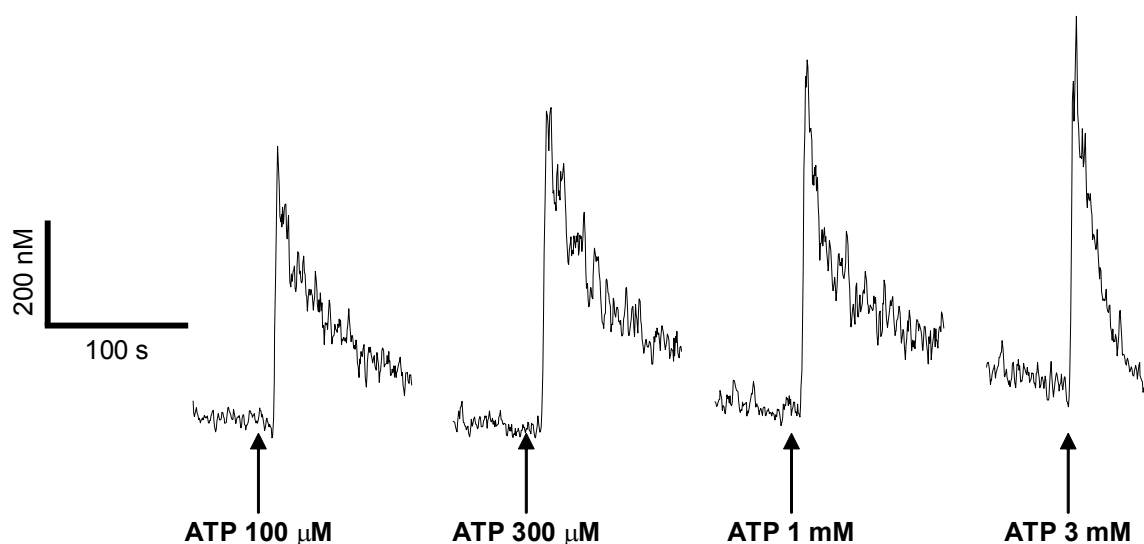
**Figura 49.- Respuestas de calcio inducidas por diferentes agonistas P2 en poblaciones de astrocitos.** Las células se estimularon con diferentes nucleótidos a una concentración de 100  $\mu$ M. La figura muestra un registro representativo de las respuestas a cada agonista.

Ya se ha comentado que, en algunos tipos celulares, el receptor  $P2X_7$ , además de regular el paso de iones a través de la membrana, también puede inducir la formación de un poro no selectivo mediante el reclutamiento de diversas proteínas. Para estudiar si este proceso tenía lugar en nuestro modelo celular, se analizó la entrada de la sonda fluorescente Yo-Pro-1 en paralelo al análisis de las respuestas de calcio. En la figura 50, aparece un registro representativo de la medida de fluorescencia emitida por la sonda en poblaciones de astrocitos tras la estimulación con BzATP. Como se puede apreciar, no se registraron cambios en la fluorescencia a pesar de realizar 3 aplicaciones sucesivas de BzATP 100  $\mu$ M. Únicamente se observaron incrementos en la fluorescencia tras la adición de Tritón X-100. El ligero incremento transitorio que se produce tras la adición de BzATP a la cubeta, es un artefacto debido a la emisión de fluorescencia del BzATP en estas condiciones experimentales, ya que dicha variación también se detecta en ausencia de las células y de la sonda fluorescente. Estos experimentos confirman que en nuestro modelo celular la estimulación prolongada del receptor de BzATP, el receptor  $P2X_7$ -like, no induce muerte celular.



**Figura 50.- Registro de la fluorescencia emitida por la sonda Yo-Pro-1.** En trazo discontinuo se representa una respuesta tipo de calcio a BzATP de una población de células en suspensión. La línea continua corresponde a la medida de la fluorescencia de la sonda Yo-Pro-1 registrada en otra población de astrocitos idéntica a la anterior. Donde se indica se adicionó 100  $\mu$ M BzATP o Triton X-100 (0,3%). Se realizaron controles sin células y sin Yo-Pro-1 que pusieron de manifiesto que las variaciones de fluorescencia observadas al aplicar BzATP eran debidas a la fluorescencia emitida por este compuesto a 509 nm cuando se excita a 490 nm.

Debido a que las concentraciones de ATP, inferiores o iguales a 100  $\mu\text{M}$ , empleadas hasta el momento no son suficientes para activar al receptor  $\text{P2X}_7$ , decidimos ensayar concentraciones mas elevadas de ATP, hasta 3 mM. Como se muestra en la figura 51, no se observaron diferencias apreciables ni en la cinética ni en la magnitud de las respuestas de calcio, siendo además comparables a las obtenidas con 100  $\mu\text{M}$  ATP o UTP. Estos resultados indican que ATP, incluso a concentraciones milimolares y UTP actúan a través del mismo receptor, los receptores metabotrópicos  $\text{P2Y}_{2/4}$ , distribuidos homogéneamente en toda la población de astrocitos, y que las respuestas de calcio inducidas por BzATP deben estar mediadas por un receptor diferente. Para determinar si el receptor  $\text{P2X}_7$  era la diana de BzATP y cual era su distribución en la población de astrocitos, se llevó a cabo la caracterización de las respuestas de calcio a este agonista en células individuales y la comparación de éstas con las inducidas por UTP y 2MeSADP previamente caracterizadas (Jimenez y cols., 2000).

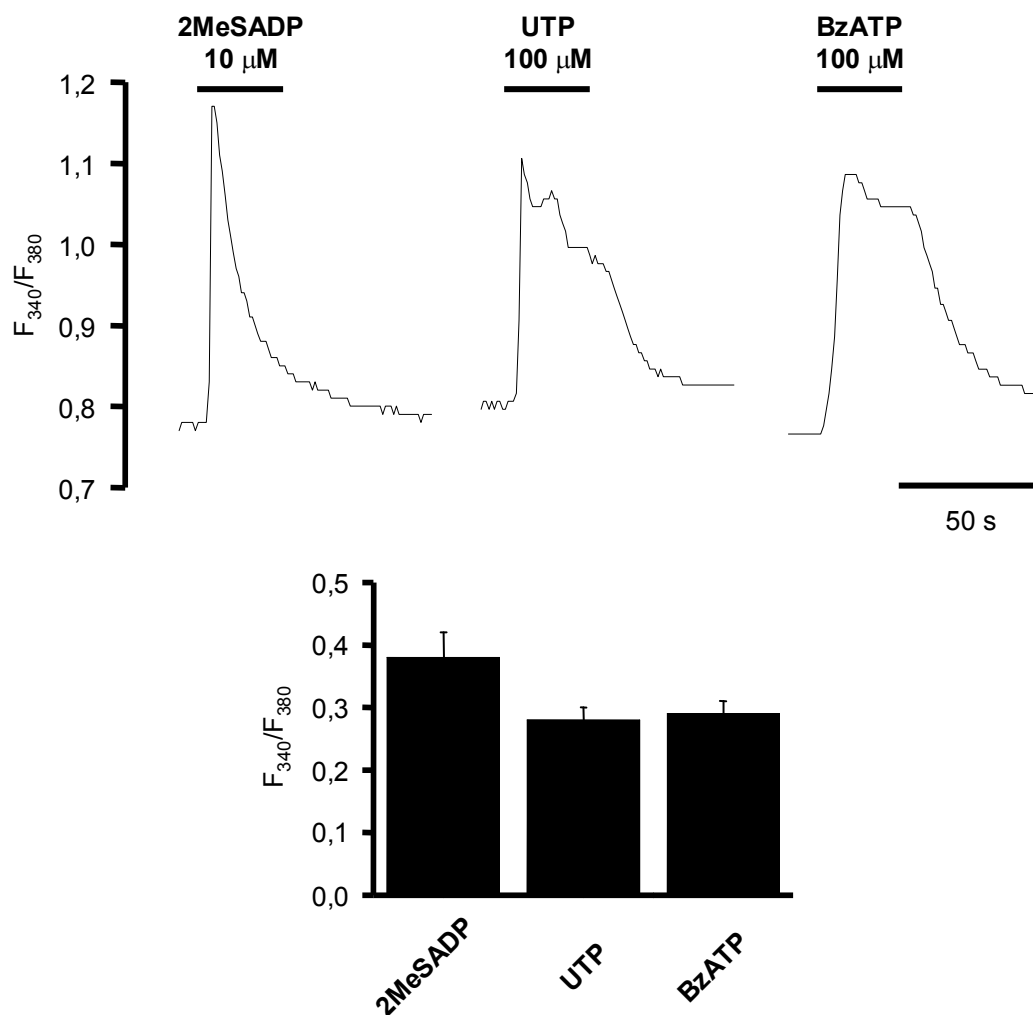


**Figura 51.- Respuestas de calcio producidas por diferentes concentraciones de ATP en poblaciones celulares.** Los astrocitos en suspensión se estimularon con 100  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$ , 1 mM o 3 mM de ATP. Se muestran registros representativos obtenidos con cada concentración.

### 2.2.2.- Caracterización de las respuestas de calcio producidas por BzATP en astrocitos individuales.

Todas las células ensayadas respondieron a estimulaciones con 100  $\mu\text{M}$  BzATP con señales intracelulares de calcio (92% de  $n=1779$  células). En la figura 52, se muestra un registro de fluorescencia típico de un astrocito tras la estimulación con 100  $\mu\text{M}$  BzATP durante 30 segundos. La cinética de la respuesta de calcio, representada como el cociente  $F_{340}/F_{380}$ , es bastante similar a las obtenidas al estimular con 10  $\mu\text{M}$  2MeSADP o 100  $\mu\text{M}$

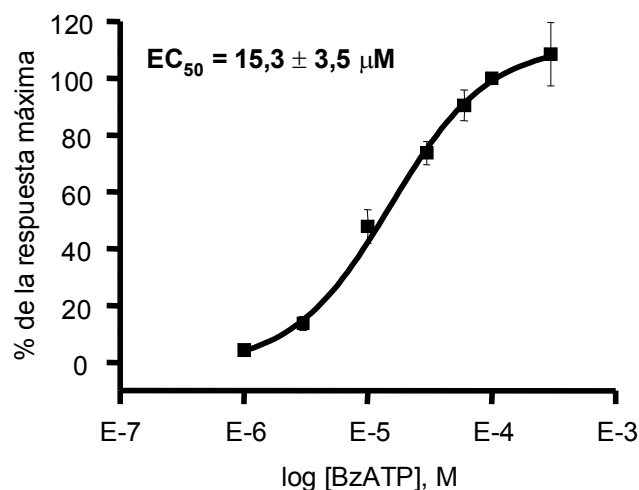
UTP. Los valores de la altura del pico inicial de la respuesta fueron de  $0,38 \pm 0,02$ ,  $0,28 \pm 0,02$  y  $0,29 \pm 0,02$  para 2MeSADP, UTP y BzATP, respectivamente. Las aplicaciones de los agonistas se realizaron en un orden aleatorio, dejando un intervalo de 5 a 10 minutos de recuperación entre las diferentes aplicaciones.



**Figura 52.- Respuestas de calcio inducidas por diferentes agonistas P2 en astrocitos individuales.** Las células se estimularon durante 30 s con 2MeSADP 10  $\mu$ M, UTP 100  $\mu$ M o BzATP 100  $\mu$ M. Los registros de la izquierda muestran un registro de cada agonista. La gráfica inferior representa la media  $\pm$  SEM de 361, 712 y 1021 células, obtenidas de diferentes cultivos, estimuladas con 2MeSADP, UTP y/o BzATP, respectivamente.

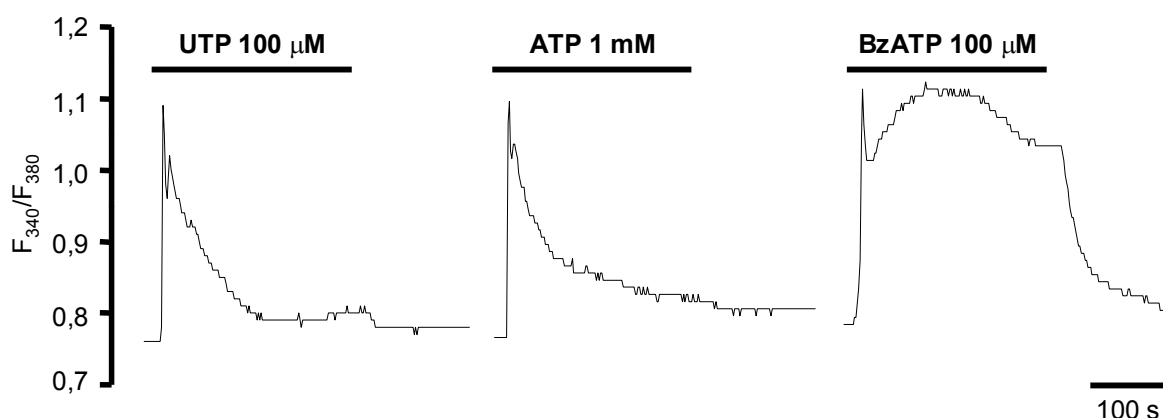
Como se muestra en la figura 53, la respuesta a BzATP era dosis dependiente con un valor de  $EC_{50}$  de  $15,3 \pm 3,5$   $\mu$ M, obteniéndose la respuesta máxima a 300  $\mu$ M BzATP. Estos datos coinciden con lo descrito por otros autores (Jiang y cols., 2000b).





**Figura 53.- Curva dosis respuesta para BzATP.** Los astrocitos se estimularon durante 30 segundos con diferentes concentraciones de agonista. Los porcentajes de respuesta se calcularon respecto a la respuesta inducida por 100  $\mu$ M de BzATP. Cada punto representa la media  $\pm$  SEM de 5 experimentos realizados con células de diferentes cultivos.

Teniendo en cuenta que el receptor P2X<sub>7</sub> no se desensibiliza cuando se estimula de manera prolongada con el agonista, decidimos estudiar que sucedía si se realizaban aplicaciones mas largas, de entre 3 y 5 minutos. Al estimular los astrocitos con 100  $\mu$ M BzATP durante varios minutos, en la mayoría de las células se distinguían dos componentes, un componente inicial transitorio seguido de otro sostenido que se mantenía mientras duraba la aplicación del agonista. Este comportamiento no fue reproducido ni por UTP 100  $\mu$ M ni por ATP 1 mM, figura 54.

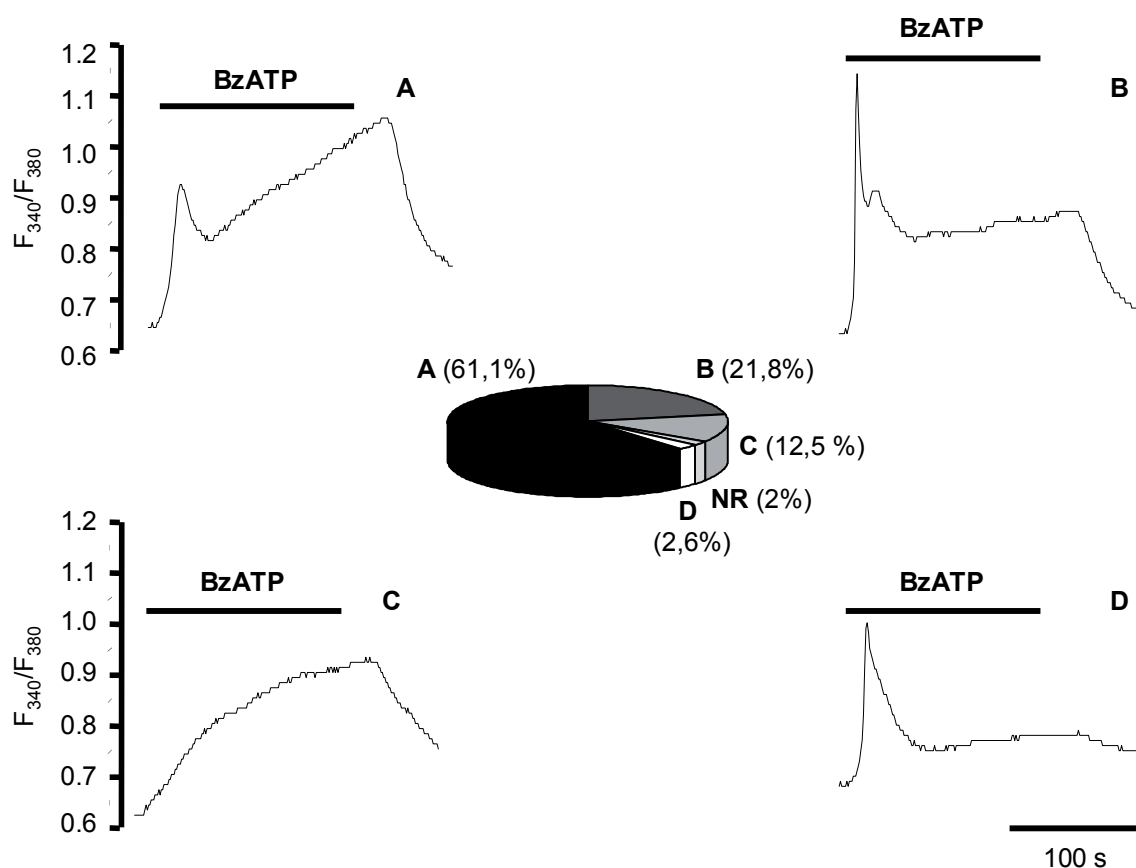


**Figura 54.- Respuestas de calcio inducidas por estimulaciones largas con diferentes nucleótidos en astrocitos cerebelosos.** Las células fueron estimuladas durante 5 minutos con UTP 100  $\mu$ M, ATP 1 mM o BzATP 100  $\mu$ M. Se muestra un registro tipo de las respuestas a cada agonista.



Un análisis mas detallado de las respuestas de calcio a BzATP, nos llevó a comprobar que esta respuesta bifásica se producía en el 83% de las células (tipo A y B de la figura 55) con una magnitud variable del componente sostenido, mientras que el porcentaje de astrocitos que sólo presentaba una de las fases, sostenida o transitoria, era muy pequeño (tipo C y D de la misma figura).

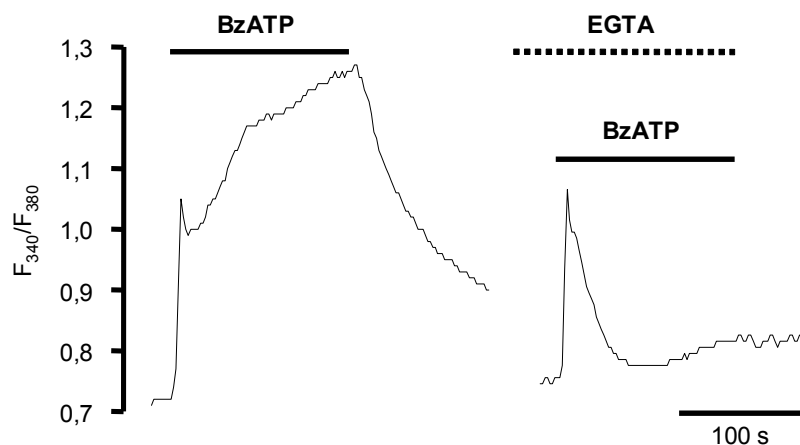
El componente sostenido comienza a observarse a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  de agonista, a la que responden cerca de un 80% de las células, de las cuales aproximadamente un 35% presenta este componente (todas del tipo B de la figura 55). Al estimular con 30  $\mu\text{M}$  BzATP, el porcentaje de cada cinética observado prácticamente coincide con el obtenido a 100  $\mu\text{M}$ .



**Figura 55.- Diferentes tipos de respuestas de calcio inducidas por BzATP en astrocitos individuales de cerebelo.** Las células se estimularon durante 3 minutos con BzATP 100  $\mu\text{M}$ . La figura muestra un registro característico de cada tipo de respuesta encontrada. En el diagrama circular se representa el porcentaje de cada uno de ellos de un total de 758 células procedentes de diferentes cultivos.

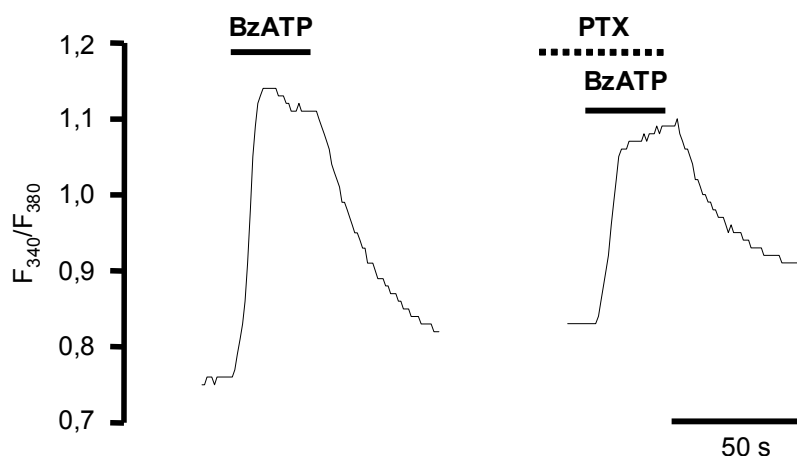
Ya que el receptor  $\text{P2X}_7$  es un receptor ionotrópico, decidimos estudiar qué sucedía al retirar el calcio del medio extracelular. Como se observa en la figura 56, el resultado fue

bastante sorprendente, porque mientras el componente sostenido se abolió completamente, el pico transitorio inicial no se modificó, lo que indicaba que estaba mediado por un mecanismo metabotrópico.



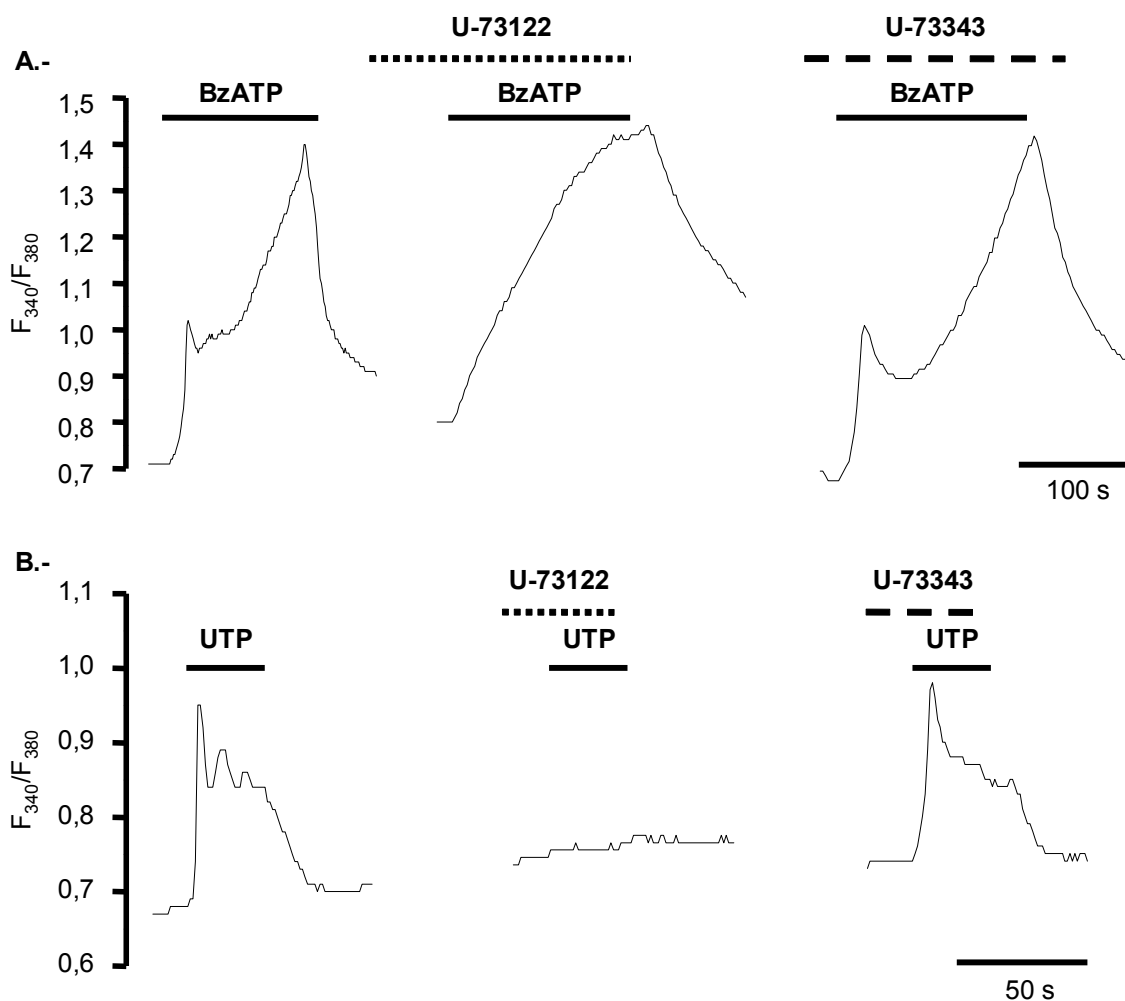
**Figura 56.- Efecto de la eliminación del calcio extracelular sobre la respuesta inducida por BzATP en astrocitos de cerebelo.** Las células se perfundieron durante 3 minutos con solución Locke normal a la que se le había quelado el calcio con una mezcla 1:1 (v/v) de Tris 1M/EGTA 1M antes de ser estimuladas 3 minutos con 100  $\mu$ M BzATP.

Con el objetivo de establecer el tipo de proteína G implicada en el componente de las respuestas de calcio a BzATP que no se eliminaba al retirar el calcio, se trataron las células con 100 ng/mL de *toxina pertussis* durante 18 horas. Dicho tratamiento apenas afectó a la respuesta del agonista, figura 57.



**Figura 57.- Efecto de la *toxina pertussis* sobre la respuesta inducida por BzATP en astrocitos de cerebelo.** Las células se trataron toda la noche con 100 ng/mL de *toxina pertussis* antes de ser estimuladas 30 segundos con 100  $\mu$ M BzATP. En la figura se muestra una respuesta tipo para cada condición.

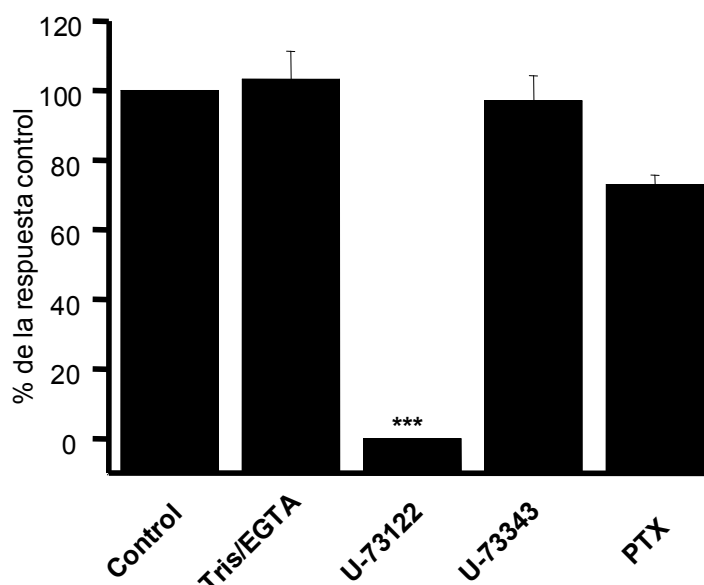
Para determinar si en la respuesta a BzATP estaba implicada la fosfolipasa C, preincubamos 3 minutos las células con 3  $\mu$ M U-73122, un inhibidor de esta enzima. En la figura 58, puede verse como el tratamiento bloqueaba el primer componente de la respuesta sin afectar al segundo. Como control se analizó el efecto sobre las respuestas a UTP, las cuales se eliminaron completamente al preincubar las células con U-73122. El análogo inactivo de este inhibidor de la fosfolipasa C, denominado U-73343, no tuvo ningún efecto sobre las respuestas inducidas por BzATP o por UTP.



**Figura 58.- Efecto del U-73122 y de su análogo inactivo, U-73343, sobre las respuestas a BzATP y UTP.** Los astrocitos se perfundieron durante 3 minutos con 3  $\mu$ M U-73122 o U-73343 antes de ser estimulados 3 minutos, en su presencia, con 100  $\mu$ M BzATP (A) o UTP (B). Se muestra un registro tipo de las repuestas obtenidas en cada condición.

En la figura 59, se muestra un diagrama resumen del efecto de los tratamientos arriba descritos sobre el pico transitorio inicial de la respuesta de calcio. Estos datos ponen de manifiesto que el receptor diana del BzATP presenta actividad metabotrópica vía fosfolipasa

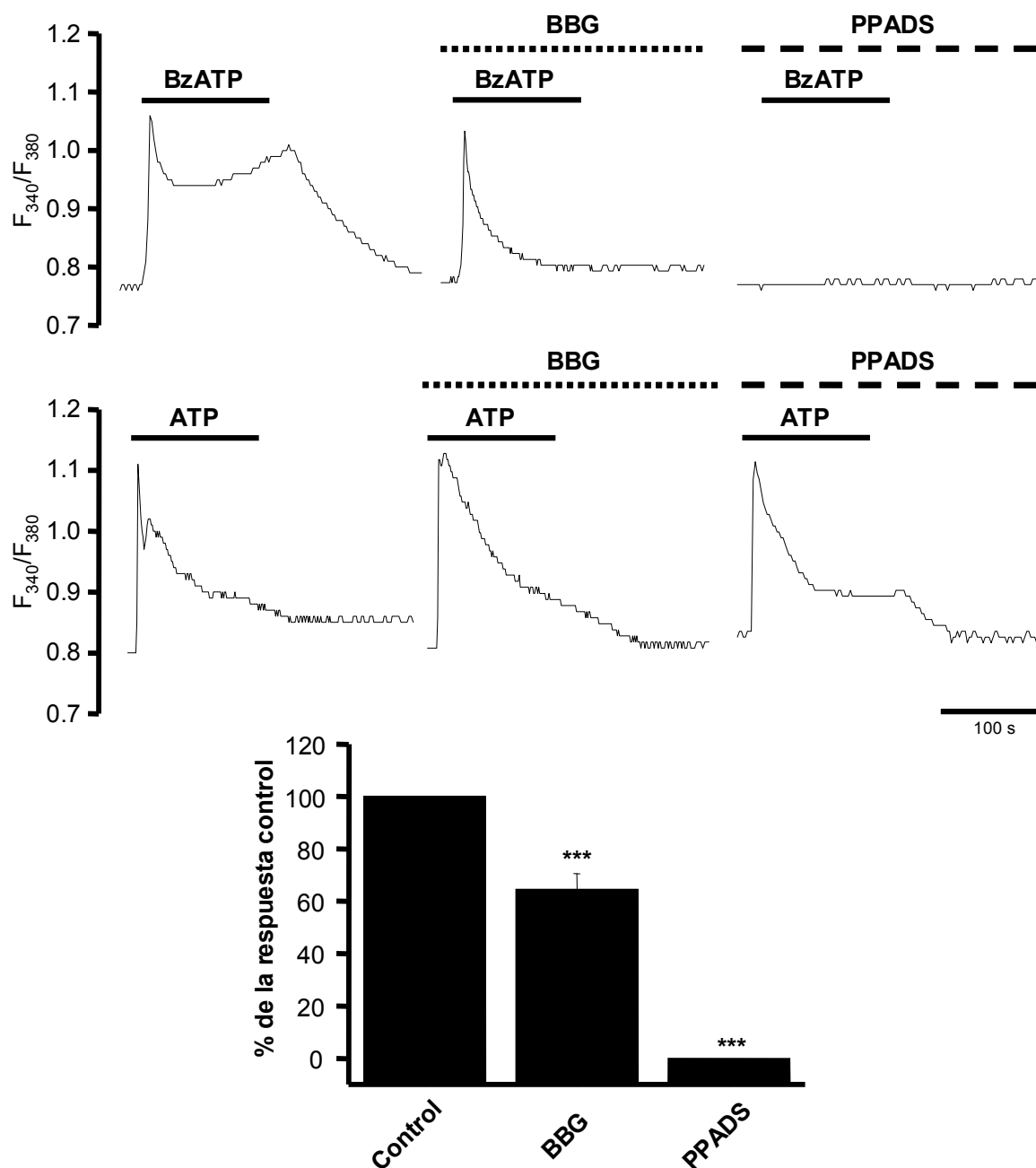
C y actividad ionotrópica induciendo la entrada de calcio extracelular en la mayoría de las células.



**Figura 59.- Efecto de los distintos tratamientos sobre el pico transitorio de la respuesta a BzATP.** Los valores corresponden a la media  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos realizados con células de cultivos diferentes.

#### 2.2.2.1.- Efecto de los antagonistas de los receptores nucleotídicos.

Para comprobar si en nuestro modelo el BzATP actuaba a través de un receptor  $P2X_7$ -like, analizamos como afectaban los antagonistas BBG y PPADS a las respuestas a este agonista. Ya se ha comentado que el BBG permite diferenciar al receptor  $P2X_7$  de otros subtipos de receptores  $P2X$  si se utiliza a bajas concentraciones (10 nM-1  $\mu$ M). Por otro lado, la sensibilidad del receptor  $P2X_7$  a PPADS, antagonista no selectivo de diversos receptores  $P2X$ , permite diferenciarlo del receptor  $P2X_4$ , que es completamente insensible a este antagonista (Soto y cols., 1996). En la figura 60, se observa que ambos antagonistas modificaron las respuestas de calcio inducidas por BzATP aunque con diferentes efectos. El BBG abolió la fase sostenida de la respuesta, y únicamente redujo un 30% el componente metabotrópico (los incrementos de fluorescencia del pico inicial en presencia de BBG fueron de  $0.19 \pm 0.01$ ,  $n = 80$  células de tres cultivos diferentes), mientras que PPADS eliminó ambos componentes. Ninguno de los dos tratamientos modificó las respuestas de calcio inducidas por ATP. Estos resultados confirman que BzATP y ATP actúan a través de diferentes receptores.

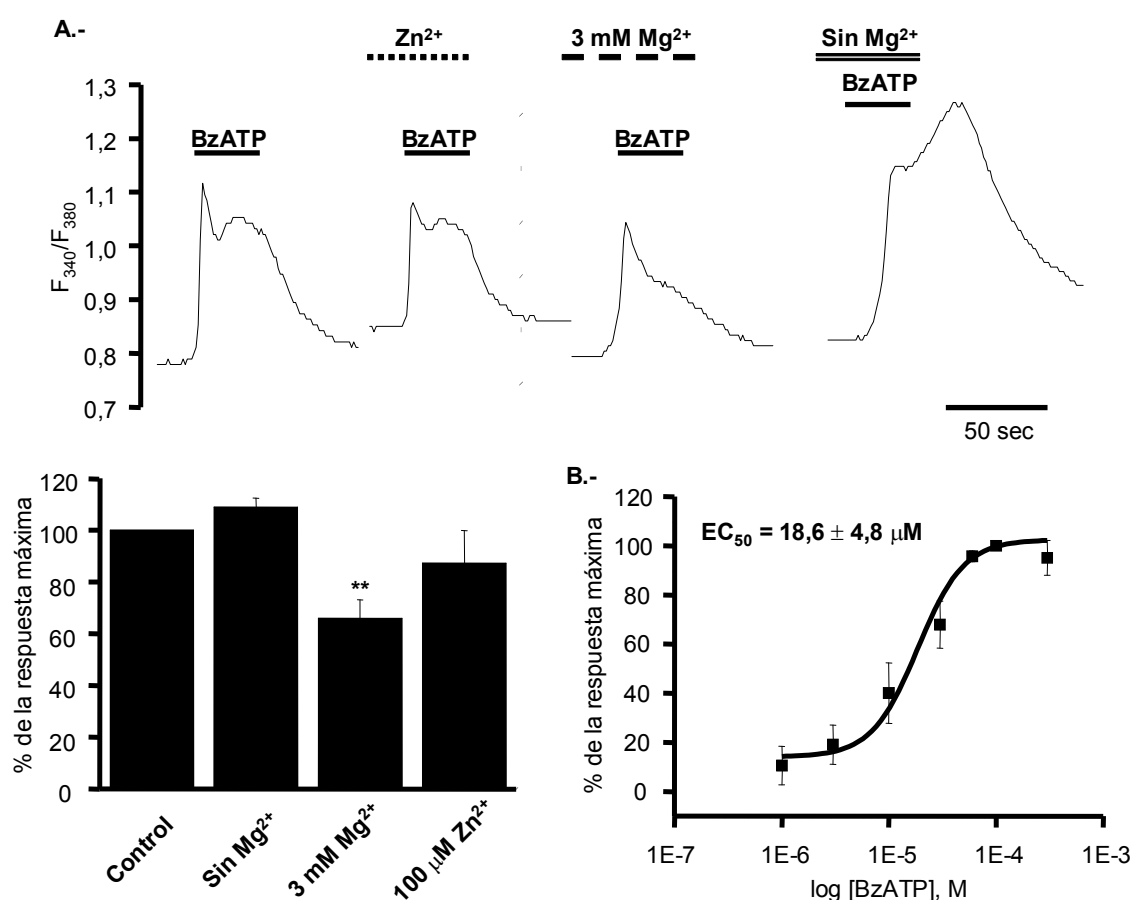


**Figura 60.- Efecto del BBG y PPADS en las respuestas de calcio inducidas por BzATP y ATP.** Las células se estimularon durante 3 minutos con BzATP 100  $\mu$ M o ATP 1 mM, donde se indica los astrocitos fueron preincubados 3 minutos con BBG 10  $\mu$ M o PPADS 30  $\mu$ M. Los registros superiores muestran una respuesta típica en cada condición. La gráfica inferior corresponde a la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos realizados con células de cultivos diferentes.

#### 2.2.2.2- Modulación de las respuestas a BzATP por iones.

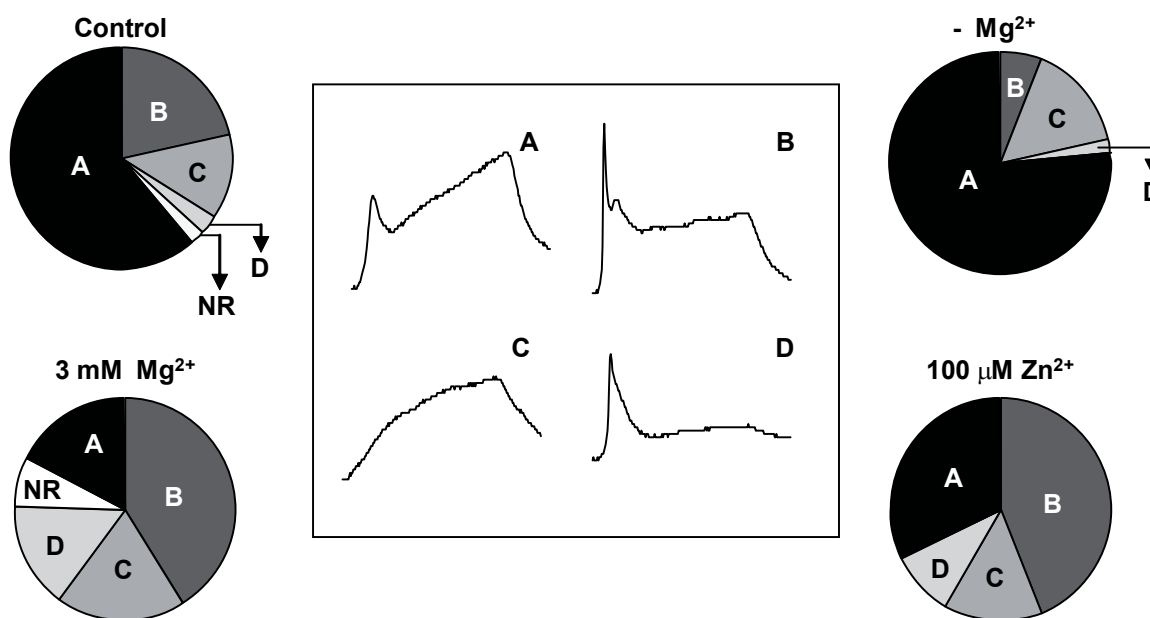
Una de las características del receptor  $P2X_7$  es que sus respuestas se potencian en ausencia de cationes divalentes, los cuales bloquean el canal (Virginio y cols., 1997). La

inhibición por zinc y cobre permite diferenciar al receptor  $P2X_7$  de otros subtipos de receptores  $P2X$ . En primer lugar, analizamos el efecto de los iones  $Mg^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  sobre el componente transitorio inicial de las respuestas de calcio inducidas por BzATP utilizando estimulaciones cortas con el agonista. Al incrementar la concentración de cationes divalentes en el medio, aumentando la concentración de  $Mg^{2+}$  o adicionando  $Zn^{2+}$ , se observa, sobre todo en el primer caso, una pequeña disminución de la magnitud del pico inicial. Por el contrario, este componente de la respuesta no se ve afectado significativamente por la retirada completa de  $Mg^{2+}$  (figura 61A). Al realizar una curva dosis respuesta en ausencia de  $Mg^{2+}$ , se obtuvo un valor de  $EC_{50}$  similar al obtenido en condiciones controles, lo que pone de manifiesto que la retirada de  $Mg^{2+}$  no afecta al componente metabotrópico (Figura 61B).



**Figura 61.- Efecto de los iones sobre las respuestas a BzATP. A.-** Las células se perfundieron 3 minutos con una solución con 100  $\mu M$   $Zn^{2+}$ , 3 mM  $Mg^{2+}$  o sin  $Mg^{2+}$  antes de su estimulación, durante 30 s, con 100  $\mu M$  de agonista preparado en el mismo medio. Los registros son representativos de cada una de las condiciones. En el diagrama inferior se indica la media  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos realizados con diferentes cultivos. **B.-** Curva dosis respuesta para BzATP en ausencia de  $Mg^{2+}$ . Los astrocitos se estimularon durante 30 s con BzATP en medio sin  $Mg^{2+}$  después de ser perfundidos durante 3 minutos en dicho medio. Los valores representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos realizados con distintos cultivos.

Sin embargo, cuando se estudió el efecto de los cationes divalentes sobre el componente sostenido de las respuestas a BzATP se comprobó que en presencia de zinc o de concentraciones elevadas de magnesio se producía una disminución en el porcentaje de células que presentaba la cinética tipo A de la figura 55. A su vez, se produjo un aumento del porcentaje de células con las cinéticas tipo B y D. Por tanto, el aumento de la concentración de iones divalentes provocó una disminución de la magnitud del componente sostenido y un incremento del número de células con respuestas que únicamente presentaban el componente metabotrópico. Por el contrario, la retirada del magnesio aumentó el porcentaje de células con cinética tipo A y C, disminuyendo el número de células con respuesta tipo B. Dicho de otro modo, se incrementó la magnitud del componente sostenido, así como el porcentaje de astrocitos que solo tenían respuestas ionotrópicas. Los porcentajes de cada cinética en las diferentes condiciones se recogen en la figura 62.



**Figura 62.- Efecto de los cationes divalentes sobre el porcentaje de los diferentes tipos de respuestas inducidas por BzATP.** Las células se perfundieron 3 minutos con una solución con 100  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$ , 3 mM  $\text{Mg}^{2+}$  o sin  $\text{Mg}^{2+}$  antes de su estimulación, durante 3 minutos, con 100  $\mu\text{M}$  de agonista preparado en el mismo medio. Los registros son representativos de cada una de las condiciones. En el diagrama inferior se indica la media  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos realizados con diferentes cultivos.

### **2.3.- Cascadas de señalización intracelular activadas por BzATP en los astrocitos cerebelosos de rata.**

Los datos anteriores demuestran que los astrocitos de cerebelo expresan un receptor P2X<sub>7</sub>-like cuya activación no induce la formación de poro citolítico, sino que provoca una

serie de cambios morfológicos. Además, este receptor exhibe actividad metabotrópica e ionotrópica.

Con el objetivo profundizar en las vías de señalización intracelular del receptor P2X<sub>7</sub>-like e identificar el mecanismo responsable de los efectos tróficos del BzATP, decidimos analizar el estado de fosforilación de algunas proteínas, tales como la PKD y las ERKs, tras la estimulación con el nucleótido. Los motivos que nos llevaron a seleccionar estas proteínas fueron varios. En primer lugar, el gran paralelismo que existe entre la localización y distribución de PKD y de los receptores de nucleótidos. PKD, su sustrato Kidins220 y varios subtipos de receptores purinérgicos están presentes en terminaciones presinápticas, células dendríticas, monocitos y en otros muchos tejidos. En segundo lugar, los nucleótidos participan en muchos de los procesos en los que PKD está también implicada, como son proliferación, apoptosis, crecimiento, plasticidad sináptica... La tercera razón por la cual nos centramos en el estudio de PKD fue que ya existían evidencias que relacionaban al receptor P2X<sub>7</sub> con esta enzima. Bradford y Soltoff (2002) habían descrito que este receptor activaba a PKD en glándulas salivares. Además, en los astrocitos cerebelosos ya habíamos detectado su activación tras la estimulación de los receptores P2Y<sub>2</sub> con UTP en los estudios realizados por Kinexus. Finalmente, teniendo en cuenta que la PKD está implicada en el transporte de proteínas desde el *trans*-Golgi a la membrana, estos estudios permitirían analizar si los receptores de nucleótidos comparten esta vía de transporte.

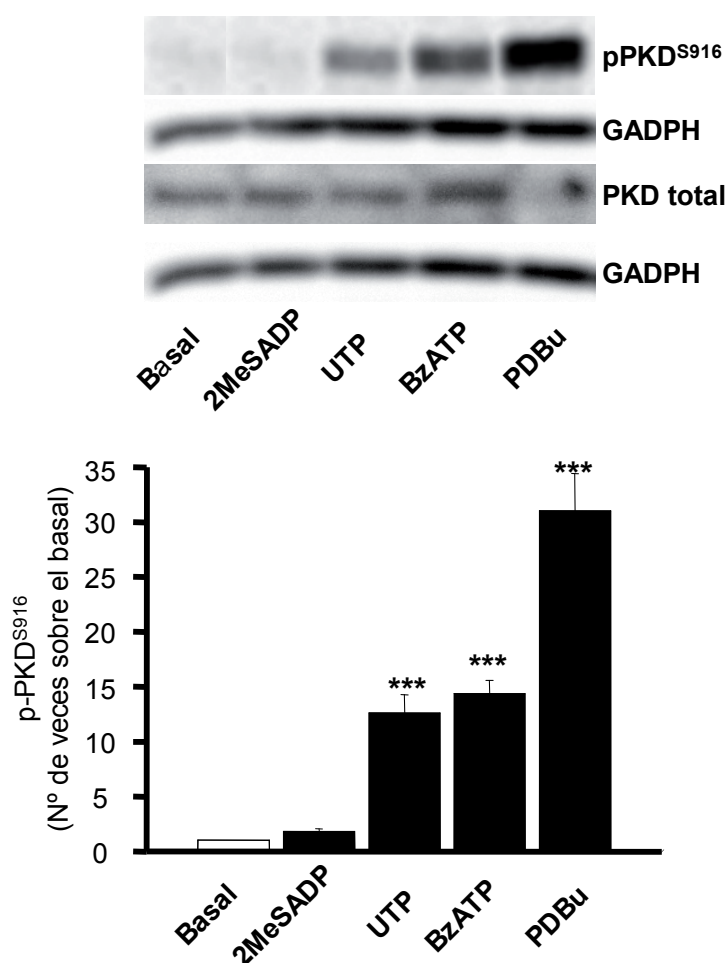
En diversos modelos celulares se ha comprobado que la PKD puede regular la cascada de las ERKs (Van Lint y cols., 2002). La activación de esta última vía por agonistas purinérgicos ya había sido establecida en trabajos anteriores del grupo (Jimenez y cols., 2002). Además, estos resultados fueron corroborados con el ensayo de Kinexus. Con el objetivo de determinar si las dos rutas de señalización estaban relacionadas en los astrocitos de cerebelo, el estudio de los mecanismos a través de los cuales BzATP activaba ambas vías se realizó de manera paralela, utilizando en la mayoría de los casos los mismos extractos celulares.

### **2.3.1.- Caracterización de la activación de PKD inducida por nucleótidos.**

Para estudiar si los receptores purinérgicos activaban a la PKD, se analizaron extractos de células estimuladas con diferentes agonistas nucleotídicos mediante ensayos de inmunotransferencia. El anticuerpo utilizado reconoce al residuo fosforilado de la Ser<sup>916</sup> de PKD1, que se autofosforila cuando se produce la activación de la enzima y cuya detección ha sido ampliamente utilizada como medida de la activación de PKD1 (Matthews y cols., 1999; Matthews y cols., 2000; Cabrera-Poch y cols., 2004). En la figura 63, se muestra que la estimulación de los astrocitos con UTP y BzATP 100  $\mu$ M durante 5 minutos indujo un incremento en la fosforilación de PKD de 12-14 veces respecto al basal. Por el contrario, 2MeSADP no modificó significativamente los niveles de activación de esta proteína. Como control positivo se estimularon las células con PDBu 200 nM durante 15 minutos.

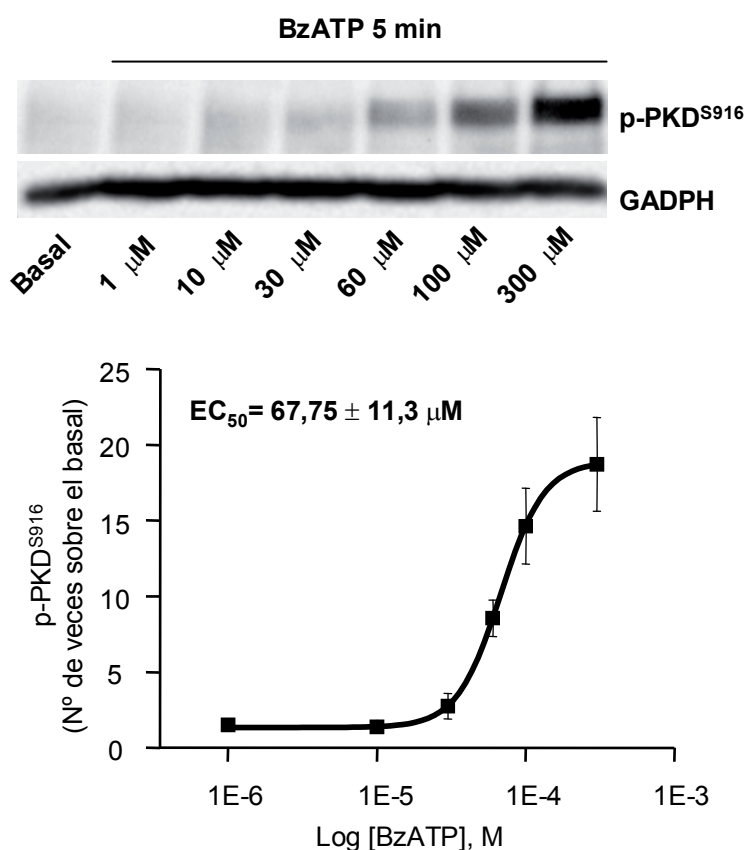


Este tratamiento incremento 30 veces el grado de fosforilación de PKD. Al cuantificar los niveles de la PKD total, se observó una disminución de los niveles de la proteína en aquellas muestras donde se producía un aumento de la forma fosforilada de PKD1. Este hecho se debe a que el anticuerpo frente a la PKD total tiene menos afinidad por la forma fosforilada y como consecuencia, se detecta una pérdida de señal aunque los niveles totales de proteína no varían. Por este motivo, la cuantificación de la PKD total no puede emplearse como control de carga, en su lugar se llevó a cabo la detección de enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH), enzima metabólica cuyos niveles de expresión no se modifican por los tratamientos realizados.



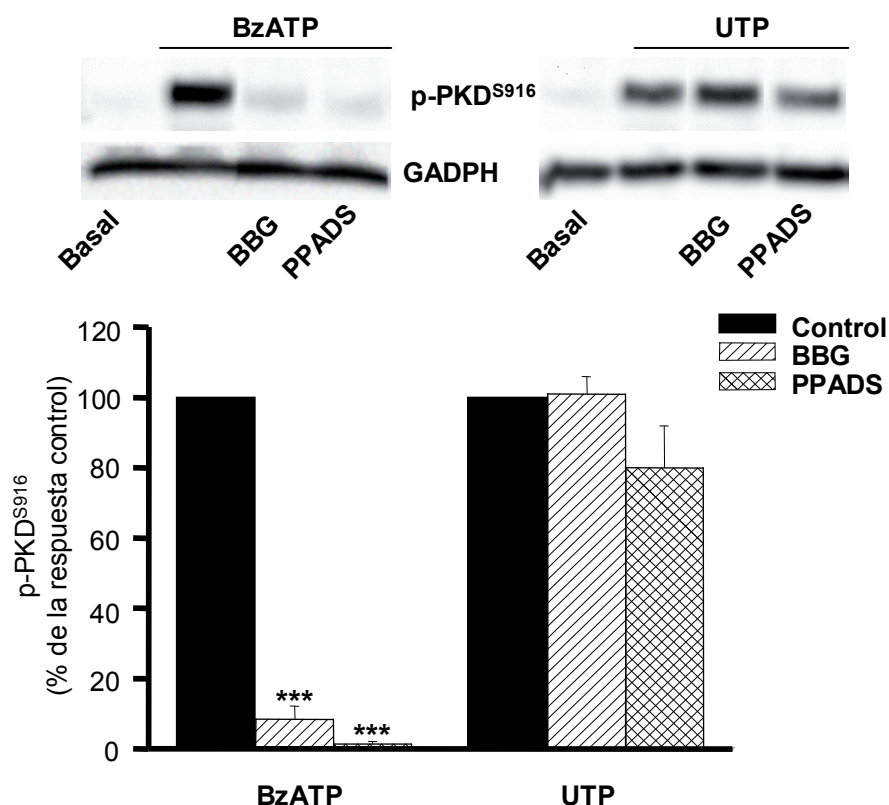
**Figura 63.- Fosforilación de PKD1 inducida por nucleótidos.** Las células se estimularon con los agonistas indicados: 2MeSADP 10  $\mu$ M, UTP 100  $\mu$ M, BzATP  $\mu$ M durante 5 minutos y PDBu 200 nM durante 15 minutos. Mediante experimentos de inmunotransferencia se detectó la presencia de p-PKD, utilizando el anticuerpo que reconoce el residuo p-Ser916, y PKD total. En el panel superior aparece un experimento tipo. En la gráfica inferior se representan las medias  $\pm$  SEM de al menos 6 experimentos para cada agonista realizados con diferentes cultivos.

En la figura 64, puede verse que la activación de PKD por BzATP era dosis dependiente con un valor de  $EC_{50}$  próximo a 70  $\mu$ M. Este valor es superior al obtenido para las respuestas de calcio, aunque en ambos casos son del mismo orden de magnitud. Además, la respuesta máxima para la activación de PKD, correspondiente a un incremento de 18 veces sobre el basal, también se alcanzó a 300  $\mu$ M. Estas coincidencias sugieren que los dos tipos de respuesta están mediadas por el mismo receptor.



**Figura 64.- Curva dosis respuesta a BzATP.** Las células se estimularon durante cinco minutos con diferentes concentraciones de agonista. El panel superior muestra un experimento representativo. En la gráfica inferior, cada punto corresponde a la media  $\pm$  SEM de tres experimentos realizados con diferentes cultivos y referidos a su control.

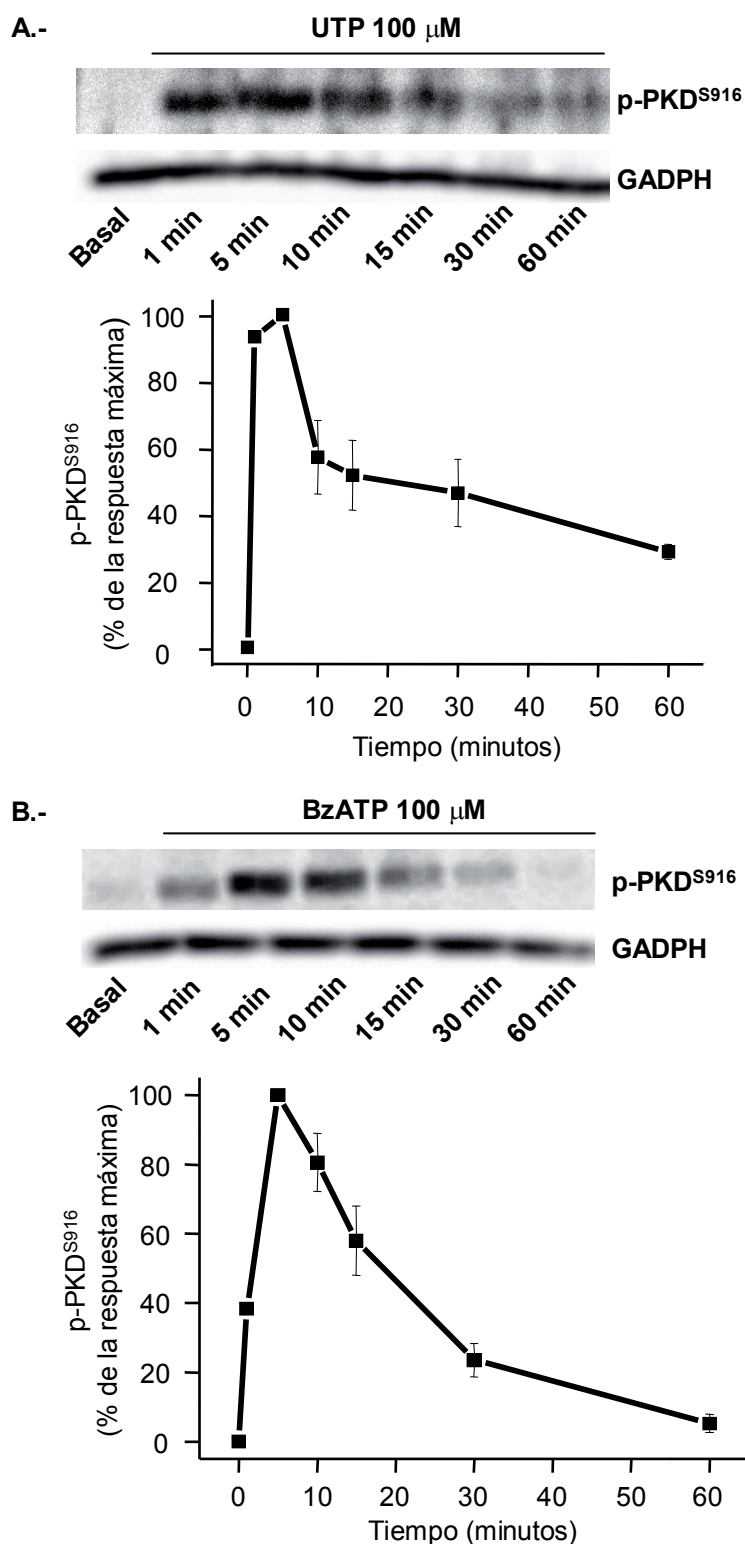
Los estudios realizados con los antagonistas BBG y PPADS corroboraron que el receptor implicado en la activación de PKD es el receptor P2X<sub>7</sub>-like. En la figura 65, se muestra como la preincubación de los astrocitos con estos compuestos bloqueó totalmente la fosforilación de PKD1 inducida por BzATP. Como era de esperar, ninguno de los dos antagonistas afectó a la respuesta inducida por UTP. Una vez más, se pone de manifiesto que UTP y BzATP activan receptores diferentes, el receptor metabotrópico P2Y<sub>2</sub>, que es insensible a PPADS y el receptor P2X<sub>7</sub>-like.



**Figura 65.- Efecto de la preincubación con BBG y PPADS sobre la activación de la proteína PKD1 inducida por BzATP y UTP.** Los astrocitos se incubaron durante 3 minutos con BBG 1  $\mu$ M o PPADS 30  $\mu$ M antes de su estimulación con BzATP o UTP 100  $\mu$ M. En el panel superior, se muestra un experimento tipo de cada experimento. En la gráfica inferior, se representan los porcentajes de activación de la proteína PKD1 después de cada tratamiento respecto a la activación inducida por cada agonista en ausencia de los antagonistas. Cada barra representa la media  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos realizados con cultivos diferentes.

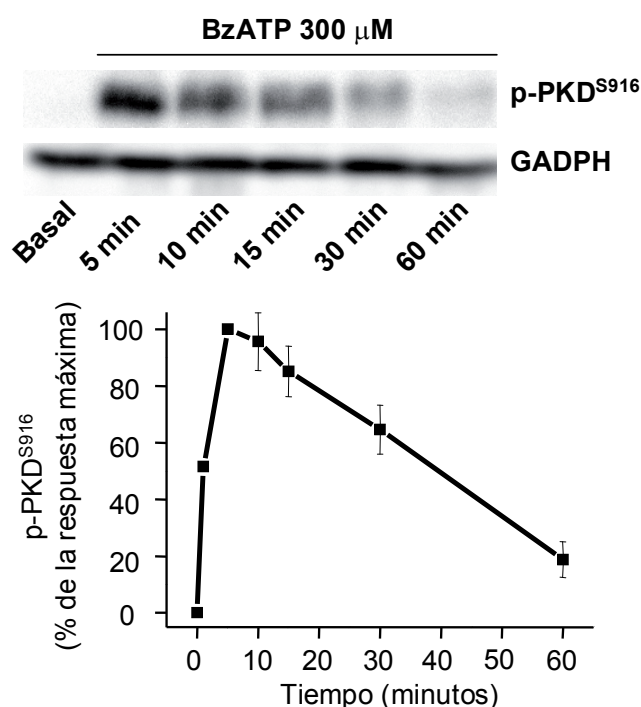
Como se ha comentado anteriormente, el efecto trófico del BzATP no se reprodujo con UTP. Es posible que ambos nucleótidos tengan como diana una misma proteína, pero que el mecanismo de activación, y por tanto su efecto, sea diferente. Con el objetivo de identificar la(s) cascada(s) de señalización responsable de la activación de PKD en nuestro modelo, se realizaron estudios en paralelo con los dos agonistas. De este modo, se podrían establecer analogías y diferencias entre ambas vías.

Cuando se estimularon las células durante diferentes tiempos con UTP o BzATP 100  $\mu$ M (figura 66), se observó que en ambos casos la activación de PKD fue transitoria. La máxima respuesta se alcanzó entre los 5 y 10 minutos, recuperándose los niveles basales al cabo de 1 hora de estimulación. Estos resultados contrastan con los datos de la bibliografía, ya que, en los distintos modelos celulares donde se ha analizado la activación de PKD en función del tiempo de estimulación con diferentes efectores, la activación se mantiene durante 30 minutos o incluso horas (Zugaza y cols., 1996; Abedi y cols., 1998).

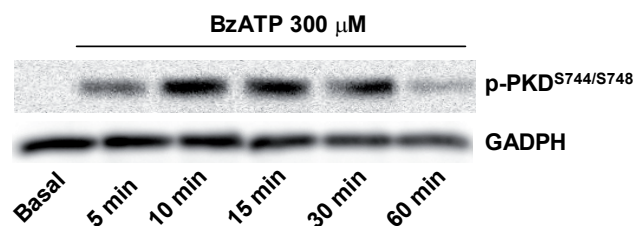


**Figura 66.- Activación de la proteína PKD1 en astrocitos incubados con UTP (A) o BzATP (B) a diferentes tiempos.** Las células se estimularon con 100  $\mu$ M de agonista desde 1 a 60 minutos. Los paneles superiores muestran un experimento tipo con cada nucleótido. En las gráficas inferiores cada punto se corresponde con la media  $\pm$  SEM de tres experimentos realizados en cultivos diferentes.

Teniendo en cuenta que, en el caso de BzATP, no se había utilizado la concentración efectiva máxima, se analizó la variación de la respuesta inducida por 300  $\mu\text{M}$  del agonista en función del tiempo. Como se muestra en la figura 67, se obtuvo un comportamiento similar. La activación también empezó a decaer a los 5 minutos, aunque más lentamente, de manera que el efecto fue más mantenido. Al igual que al estimular con BzATP 100  $\mu\text{M}$ , los niveles basales ya se habían recuperado tras una hora de incubación. Con el fin de confirmar que efectivamente la activación de PKD era transitoria, se realizaron nuevos ensayos de inmunotransferencia con los extractos de las células estimuladas con BzATP 300  $\mu\text{M}$ . En este caso, se utilizó un anticuerpo que reconoce la forma fosforilada de PKD en los residuos Ser744/Ser748, cuya transfosforilación, por miembros de la subfamilia de las nuevas PKCs, es imprescindible para que se produzca la activación de esta enzima. El resultado obtenido fue el mismo que el observado con el anticuerpo que reconoce el residuo p-Ser916 (figura 68), quedando totalmente demostrado que la activación inducida por nucleótidos en los astrocitos de cerebelo de rata era transitoria. Al no observarse diferencias significativas entre las dos concentraciones de BzATP, los experimentos posteriores se realizaron con 100  $\mu\text{M}$ , concentración a la cual se observa un aumento elevado de los niveles de fosforilación de PKD.

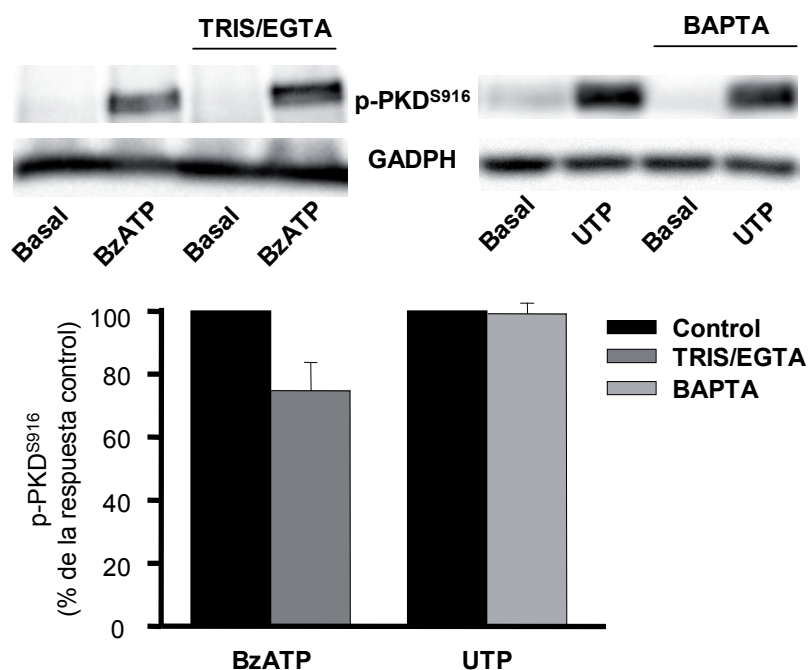


**Figura 67.- Fosforilación del residuo Ser<sup>916</sup> de la proteína PKD en astrocitos incubados con 300 $\mu\text{M}$  BzATP a diferentes tiempos.** Las células se estimularon con 300  $\mu\text{M}$  de agonista desde 1 a 60 minutos. Los extractos se revelaron con el anticuerpo que reconoce al residuo p-Ser<sup>916</sup> de la PKD. El panel muestra un experimento tipo. La gráfica representa la media  $\pm$  SEM de cuatro experimentos distintos realizados con extractos obtenidos de diferentes cultivos.



**Figura 68.- Fosforilación de los residuos Ser<sup>744</sup>/Ser<sup>748</sup> de la proteína PKD en astrocitos incubados con 300  $\mu$ M BzATP a diferentes tiempos.** Los mismos extractos celulares empleados en el experimento tipo que se muestra en la figura 67 se revelaron con el anticuerpo que reconoce los residuos Ser<sup>744</sup>/Ser<sup>748</sup> de la PKD.

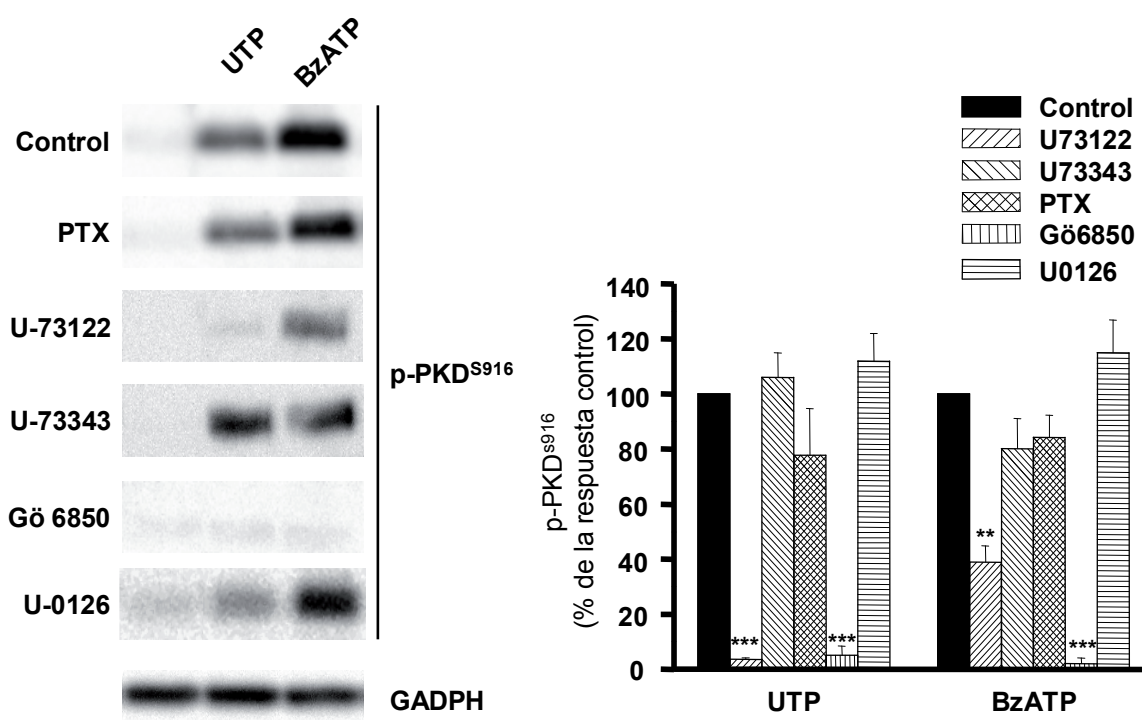
Teniendo en cuenta que, según los resultados obtenidos en los experimentos de fluorimetría, el receptor P2X<sub>7</sub>-like expresado en los astrocitos de cerebelo está acoplado a cascadas de señalización metabotrópicas e ionotrópicas, decidimos analizar si la activación de la PKD era dependiente de calcio (figura 69).



**Figura 69.- Efecto de la eliminación del calcio en la activación de PKD1 inducida por BzATP o UTP.** Las células se preincubaron durante cinco minutos con una mezcla 1:1 (V/V) de TRIS 1M y EGTA 1M antes de su estimulación con BzATP 100  $\mu$ M. Antes de la estimulación con UTP 100  $\mu$ M, los astrocitos fueron pretratados 30 minutos con BAPTA 10  $\mu$ M. En el panel superior se muestran un experimento tipo de cada condición. En el diagrama inferior están representadas las medias  $\pm$  SEM de 3 experimentos realizados con diferentes cultivos. Los valores se dan en porcentajes de la respuesta inducida por los agonistas.

Como se muestra en la figura 69, en ausencia de calcio extracelular el BzATP induce un aumento en los niveles de fosforilación de PKD igual al 80% de la respuesta observada en condiciones normales (2,5 mM calcio extracelular). Asimismo, el efecto del UTP tampoco se modificó por el pretratamiento de las células con el quelante de calcio BAPTA-AM, capaz de penetrar en las células y unirse al calcio intracelular. Por tanto, la activación de PKD1 por ambos nucleótidos puede considerarse calcio independiente (figura 69). Este resultado concuerda con una activación de PKD mediada por PKC $\eta$  o PKC $\epsilon$ . Estas proteínas, pertenecientes a la familia de las PKCs nuevas, fosforilan a PKD y su activación es dependiente de DAG pero independiente de calcio.

Con el objetivo de profundizar en el mecanismo responsable de la activación de la PKD por UTP y BzATP los astrocitos fueron sometidos a diferentes pretratamientos antes de la estimulación con dichos nucleótidos (figura 70).



**Figura 70.- Efecto de diferentes tratamientos sobre la activación de PKD1 inducida por UTP y BzATP.** Las células se preincubaron con los compuestos indicados en la figura: U-73122 y U-73343 3  $\mu$ M durante 10 minutos, *toxina pertussis* 100 ng/ml durante toda la noche y Gö6850 5  $\mu$ M durante 20 minutos antes de su estimulación con 100  $\mu$ M UTP o BzATP. En la parte superior se muestra un experimento tipo para cada condición. La gráfica representa las medias  $\pm$  SEM de 3 experimentos realizados con cultivos diferentes. Los valores se expresan en porcentajes de la respuesta inducida por los agonistas.

Una de las posibles vías por las que se genera DAG es la activación de la PLC. Por ello, las células se incubaron con U-73122, un inhibidor de la PLC, que, como se muestra



en la figura 70, bloqueó completamente la respuesta a UTP y redujo considerablemente el efecto del BzATP. Este resultado indica que el receptor P2X<sub>7</sub>-like presente en nuestras células está acoplado parcialmente a la activación de PLC. Ambas respuestas no se modificaron por la incubación de las células con el U-73343, el análogo inactivo del U-73122. Con el objetivo de identificar que proteína G estaba implicada en la fosforilación de PKD, los astrocitos se trataron toda la noche con 100 ng/mL de *toxina pertussis*. Este pretratamiento no modificó la activación de PKD1 inducida por UTP o por BzATP. Por tanto, la respuesta parece estar mediada por una proteína Gq. Posteriormente, quisimos confirmar que las PKCs involucradas en la activación de PKD pertenecían a la familia de las PKCs nuevas. Para ello, los astrocitos se preincubaron con el inhibidor de las nPKCs, el Gö6850, que eliminó por completo la fosforilación de PKD1.

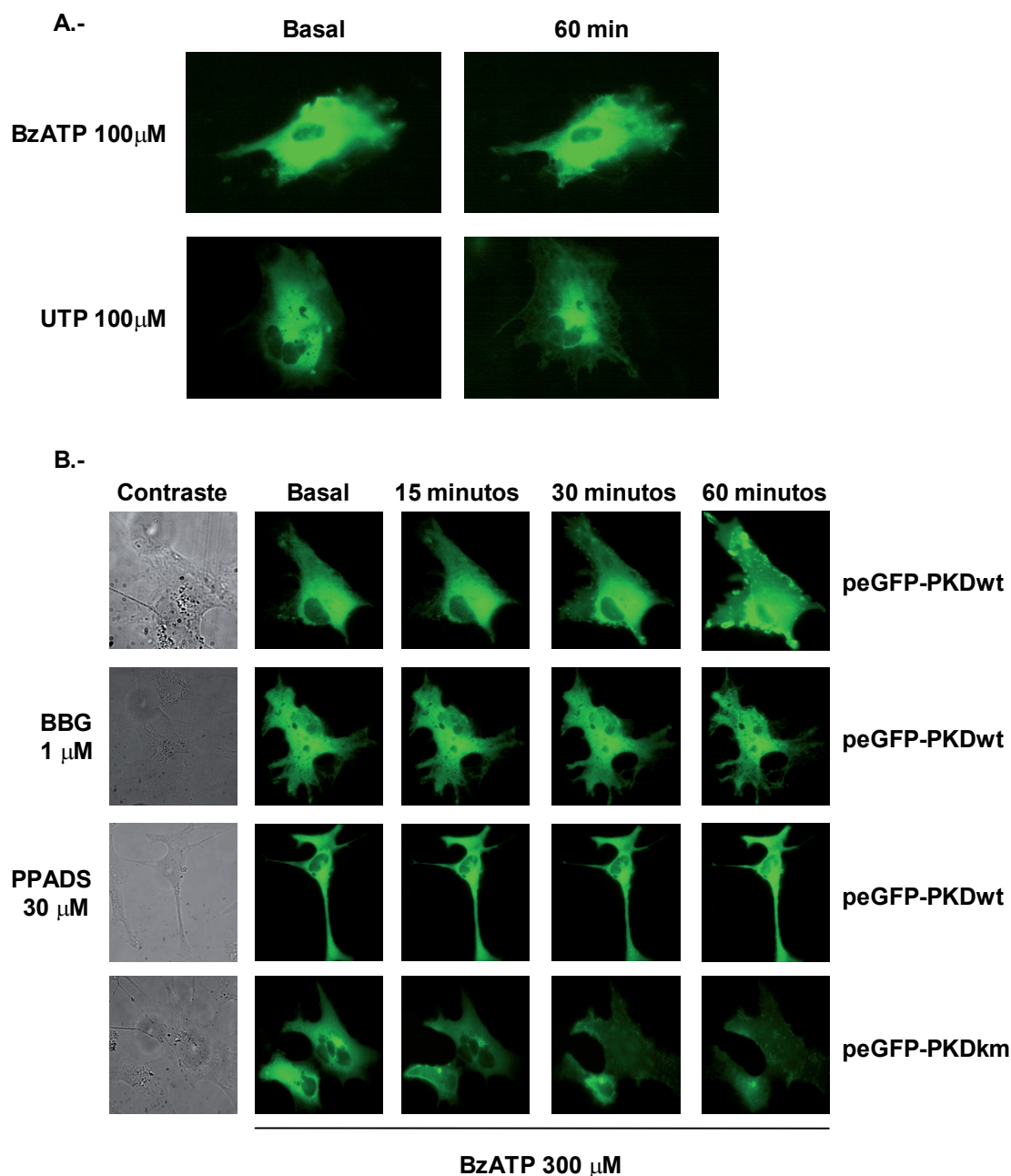
Como se ha comentado anteriormente, uno de los objetivos de la caracterización de las vías de señalización activadas por BzATP era determinar si existía algún tipo de interacción entre ellas. Por dicho motivo, se analizó el efecto del U-0126, un inhibidor de las proteínas MEK que fosforilan a las proteínas ERKs. El pretratamiento con este compuesto no afectó a la fosforilación de PKD inducida por BzATP o por UTP. Este resultado descarta que las proteínas ERKs estén implicadas en la activación de PKD.

#### 2.3.1.1.- Translocación de PKD1 inducida por BzATP.

En muchos modelos se ha descrito la translocación de PKD a distintos compartimentos subcelulares tras la aplicación de un estímulo que provoque un aumento en la concentración local de DAG. Una de las rutas por las que se genera este segundo mensajero es la hidrólisis de fosfatidil-4,5-bisfosfato de la membrana realizada por PLC. Como los resultados anteriores indican que el receptor sensible a BzATP expresado en los astrocitos de cerebelo esta acoplado a la PLC, decidimos estudiar si la activación de PKD1 por este agonista iba acompañada de un cambio en su localización intracelular.

Los astrocitos se transfectaron de manera transitoria con el plásmido pEGFP-PKDwt. La distribución de la proteína en células en reposo era citoplasmática, localización que no se vio modificada al estimular las células con UTP o BzATP 100  $\mu$ M (figura 71A). Sin embargo, la estimulación con PDBu 200 nM indujo la translocación de PKD1 a los 15 minutos, de manera similar a lo descrito por otros autores en células COS-7 transfectadas transitoriamente con GFP-PKD1 (Matthews y cols., 1999). En los experimentos de inmunotransferencia habíamos visto que a 100  $\mu$ M de BzATP la activación de PKD1 era submáxima, por ello decidimos utilizar una concentración de agonista mayor. Después de 20-30 minutos de estimulación con BzATP 300  $\mu$ M, PKD1 se translocó a membrana, figura 71B. El efecto fue irreversible, ya que no se observó ningún otro cambio en la localización aunque la estimulación se prolongo durante, al menos, 30 minutos más. En la misma figura, se muestra como los antagonistas del receptor P2X<sub>7</sub>, el PPADS y el BBG, bloquearon la translocación de PKD1.



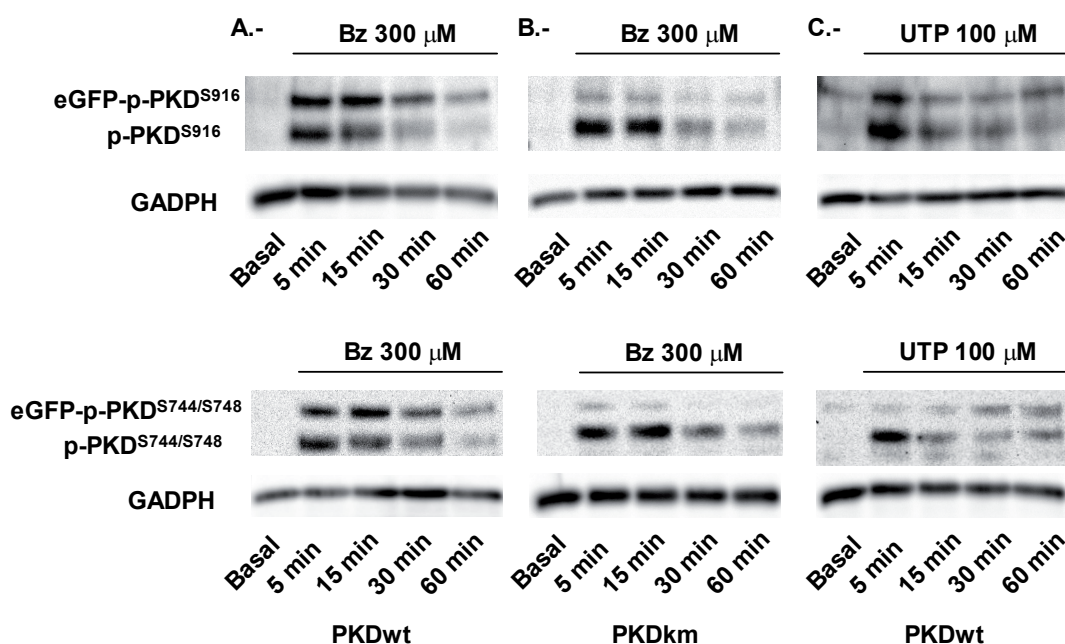


**Figura 71.- Efecto del BzATP y del UTP 100  $\mu$ M sobre la localización intracelular de PKD.**  
**A.-** Las células se estimularon durante 1 hora con 100  $\mu$ M BzATP o 100  $\mu$ M UTP. Se tomaron imágenes cada 5 minutos sin que se detectara la translocación de la proteína. Se muestran las primeras y últimas imágenes de la serie realizada con cada agonista. **B.-** Los astrocitos transfectados transitoriamente con peGFPwt o peGFPkm se estimularon con BzATP 300  $\mu$ M. Donde se indica las células se preincubaron 3 minutos con BBG 1  $\mu$ M o PPADS 30  $\mu$ M.

Que BzATP y UTP 100  $\mu$ M indujeran la activación de PKD1 pero no su translocación sugiere que ambos procesos son independientes. Matthews y cols. (1999) han descrito que estos sucesos son distintos aunque tienen lugar de manera paralela. Al igual que en este

trabajo, la activación máxima de la PKD1 en los astrocitos de cerebelo se alcanza antes de que se inicie la translocación. Con el objetivo de confirmar que en los astrocitos ambos efectos eran independientes, las células se transfectaron transitoriamente con el plásmido pEGFP-PKDkm, de manera que expresaban una forma inactiva de PKD1 (PKDkm). PKDkm presenta una mutación en el dominio catalítico que impide su activación, pero mantiene intactos los dominios que intervienen en la interacción con DAG, principalmente la región Cys2, implicados en la translocación. La estimulación de los astrocitos con BzATP 300  $\mu$ M también indujo la translocación de la PKD inactiva (figura 71B). Por tanto, estos resultados demuestran que la translocación no requiere la activación de PKD1.

Para comprobar que eGFP-PKD1 se comportaba de igual manera que la PKD1 endógena se realizaron experimentos de inmunotransferencia con extractos de células transfectadas con pEGFP-PKDwt y estimuladas distintos tiempos con BzATP 300  $\mu$ M y UTP 100  $\mu$ M (figura 72).



**Figura 72.- Activación de la proteína PKD1 en astrocitos transfectados** transitoriamente con GFP-PKDwt (A, C) o GFP-PKDkm (B) incubados con BzATP 300  $\mu$ M (A, B) o UTP 100  $\mu$ M (C) durante 5 minutos. Los extractos se revelaron con el anticuerpo que reconoce el residuo p-Ser916 (paneles superiores) y con el anticuerpo frente a los residuos p-Ser744/748 (paneles inferiores).

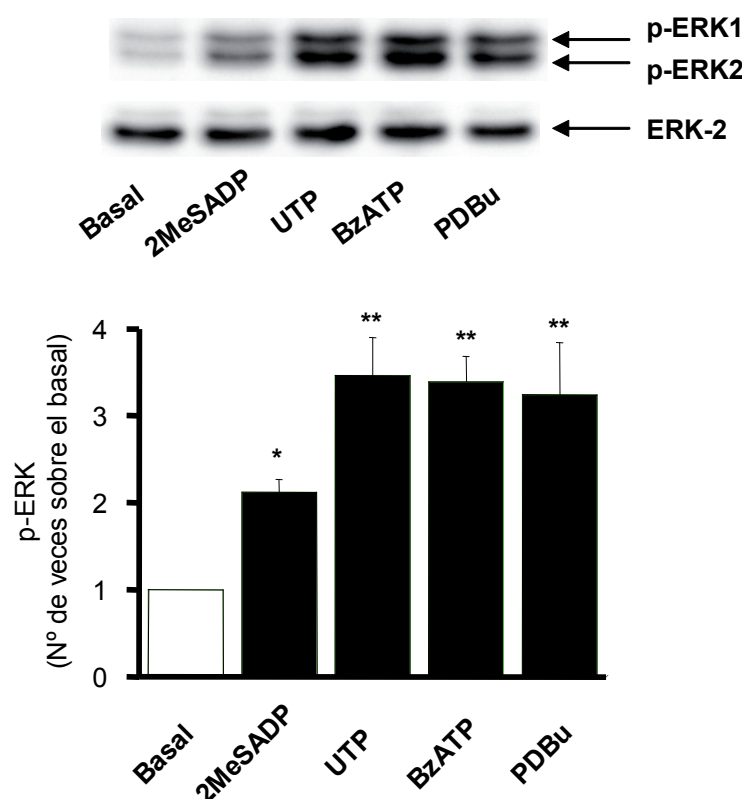
En el caso del BzATP, se observó que la variación de la fosforilación de la eGFP-PKDwt respecto al tiempo era igual a la observada para la proteína endógena, independientemente del anticuerpo utilizado. Por tanto, cabe esperar que la distribución de PKD1 observada en las células transfectadas refleje lo que ocurre con la proteína endógena. Para comprobar que efectivamente PKD-km era inactiva se estimularon células, transfectadas con dicha construcción, con 300  $\mu$ M BzATP. En estos extractos no se detectó aumento en la fosforilación de eGFP-PKDkm en ninguno de los residuos reconocidos por los anticuerpos utilizados. Sin embargo, el UTP 100  $\mu$ M induce un aumento en los niveles de fosforilación del residuo Ser<sup>916</sup> de proteína endógena y de la proteína eGFP-PKDwt, mientras que solamente provoca un aumento en la fosforilación de los residuos Ser<sup>744</sup>/Ser<sup>748</sup> de la proteína endógena.

### **2.3.2.- Estudio de la activación de la proteína ERK por BzATP en astrocitos tipo1 de cerebelo de rata.**

Como se comentó en el apartado de la introducción, el receptor P2X<sub>7</sub> puede activar a diferentes proteínas MAPKs, entre ellas a las ERKs (Panenka y cols., 2001; Bulanova y cols., 2005). Por ello, decidimos estudiar si en los astrocitos de cerebelo, el BzATP inducía la fosforilación de estas proteínas y cuál podía ser el mecanismo implicado. Del mismo modo que en los ensayos con PKD, llevamos a cabo, en paralelo, el análisis de la activación de las ERKs por el receptor P2Y<sub>2</sub>, que puede estar acoplado a la cascada de las MAP kinasas a través de la activación tanto de proteínas G<sub>q</sub> como de proteínas G<sub>i</sub>, y analizar las posibles similitudes y diferencias entre los mecanismos que pueden activar ambos agonistas.

En la figura 73, se muestra como la fosforilación de las proteínas ERKs inducida por la estimulación de las células con BzATP 100  $\mu$ M o UTP 100  $\mu$ M eran comparables entre sí y de la misma magnitud que la provocada por PDBu.

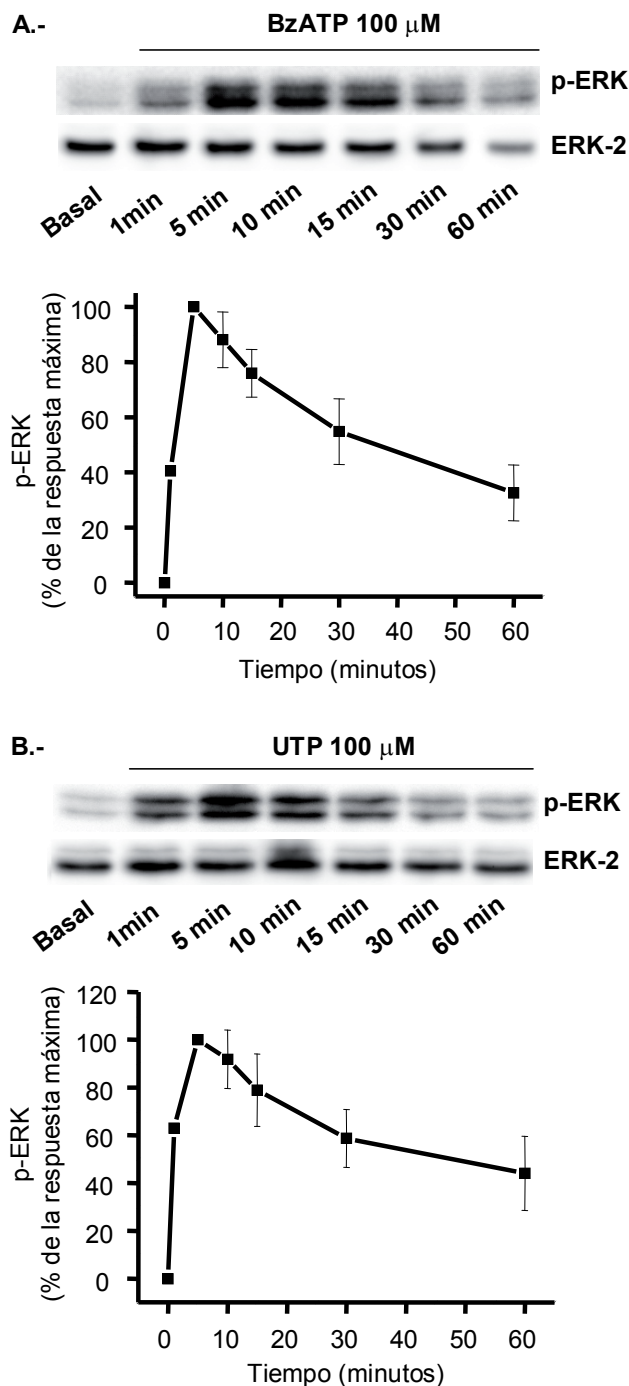
La variación de los niveles de fosforilación de las proteínas ERKs inducida por los nucleótidos difiere del comportamiento observado en el caso de la PKD. En este último caso, la activación de las PKCs reguladas por DAG con PDBu inducía un incremento de los niveles de fosforilación de PKD del doble de los valores observados con los agonistas purinérgicos. Además, el aumento de la fosforilación de las proteínas ERKs inducido por UTP, BzATP y PDBu, de aproximadamente de 3,5 veces sobre el basal, es mucho menor que el detectado en el caso de PKD1. La respuesta a estos compuestos es mayor que la producida por 2MeSADP 10  $\mu$ M, con un valor de 2 veces sobre el basal. Esta mayor activación de las proteínas ERKs por BzATP que por 2MeSADP coincide con lo descrito en astrocitos corticales por Panenka y cols (2001).



**Figura 73.- Activación de las proteínas ERK tras la estimulación con nucleótidos.** Las células se estimularon con los agonistas indicados: 2MeSADP 10  $\mu$ M, UTP 100  $\mu$ M, BzATP  $\mu$ M durante 5 minutos y PDBu 200 nM durante 15 minutos. Mediante experimentos de inmunotransferencia se detectó la presencia de las proteínas p-ERK1/2 y ERK-2. En el panel superior aparece un experimento tipo. En la gráfica inferior se representan las medias  $\pm$  SEM de al menos 7 experimentos para cada agonista realizados con diferentes cultivos.

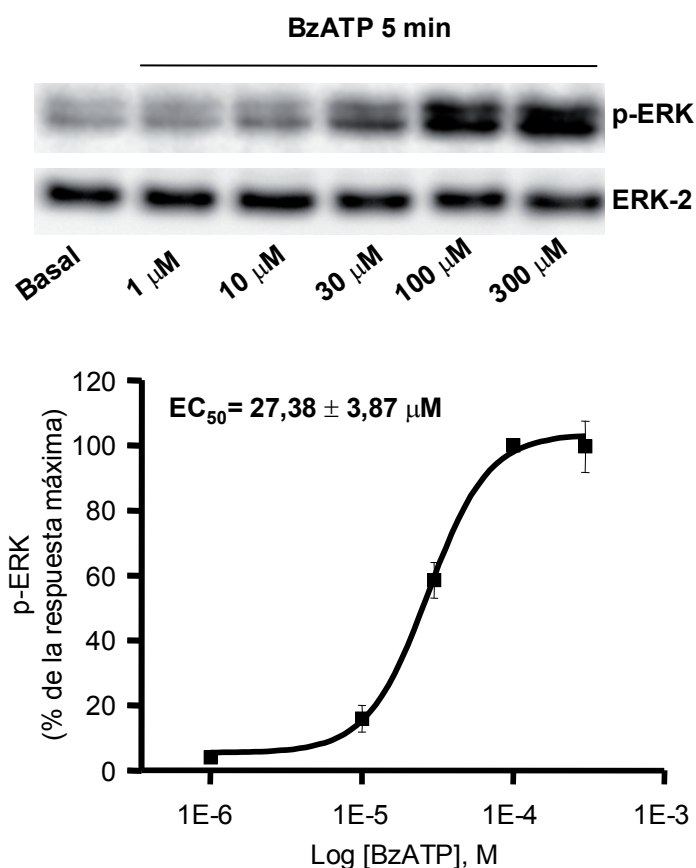
La fosforilación inducida por BzATP 100  $\mu$ M era transitoria, figura 74A, el máximo efecto tuvo lugar a los 5 minutos de estimulación, recuperándose los niveles basales a la hora de incubación. Esta activación transitoria de las ERKs inducida por P2X<sub>7</sub> ha sido descrita también por otros autores, variando el tiempo de respuesta máxima entre los 5 y los 15 minutos. En algunos casos, la vuelta a los niveles basales tenía lugar al poco tiempo de estimulación, por ejemplo en mastocitos de ratón se produce a los 30 minutos (Bulanova y cols., 2005). Sin embargo, en astrocitos corticales no se recuperan hasta 3 horas después de iniciarse la incubación (Panenka y cols., 2001). Según otros autores existe una activación asincrónica de ERK1/2, de manera que solo detectan un aumento en la fosforilación de ERK2, mientras que apenas se observan cambios en ERK1 (Amstrup y Novak, 2003). La respuesta a UTP 100  $\mu$ M también presentaba un pico de activación a los 5 minutos (figura 74B). Sin embargo el nivel de fosforilación decaía más lentamente que en el caso del BzATP. Esta variación en los niveles de fosforilación de ERK1/2 en función del tiempo coincide con

los resultados de otros autores, según los cuales, la máxima activación de ERK2 tiene lugar a los 5 minutos, recuperándose los niveles basales entre los 15 minutos y la hora (Soltoff y cols., 1998).



**Figura 74.- Activación de la proteína ERK en astrocitos incubados con UTP (A) o BzATP (B) a diferentes tiempos.** Las células se estimularon con 100  $\mu$ M de agonista desde 1 a 60 minutos. En los paneles superiores se muestra un experimento tipo. En las gráficas inferiores cada punto corresponde a la media  $\pm$  SEM de tres experimentos realizados en cultivos diferentes.

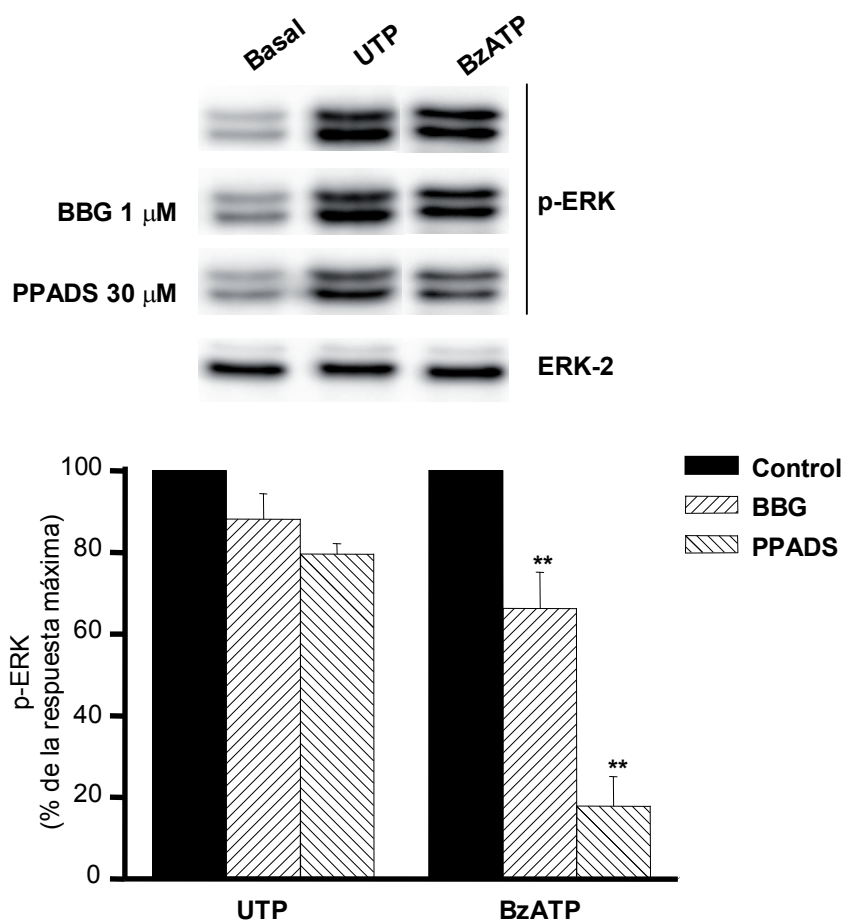
Como se observa en la figura 75, la activación inducida por BzATP era dosis dependiente, con un valor de  $EC_{50}$  de  $27,38 \pm 3,87 \mu\text{M}$ , alcanzándose el máximo de activación a una concentración de  $100 \mu\text{M}$ . Existen divergencias entre los resultados obtenidos por distintos grupos respecto a que concentración se produce la respuesta máxima. Gendron y cols. (2003b) obtuvieron un valor de  $50 \mu\text{M}$  para el  $P2X_7$  de rata expresado en células de astrocitoma 1321N1, mientras que Panenka y cols (2001), observan que la respuesta sigue aumentando a concentraciones superiores a  $1\text{mM}$  BzATP en astrocitos de corteza.



**Figura 75.- Curva dosis-respuesta a BzATP.** Las células fueron estimuladas durante cinco minutos con diferentes concentraciones de agonista. El panel superior muestra un experimento representativo. En la gráfica inferior, cada punto corresponde a la media  $\pm$  SEM de tres experimentos realizados con diferentes cultivos y están referidos a su control.

Los estudios realizados con BBG y PPADS corroboraron que el BzATP y el UTP actuaban a través de diferentes receptores. Como puede verse en la figura 76, la respuesta a UTP no fue modificada significativamente por ninguno de los antagonistas utilizados,

mientras que la fosforilación inducida por BzATP disminuyó al preincubar las células con BBG y se bloqueó casi por completo por el PPADS.

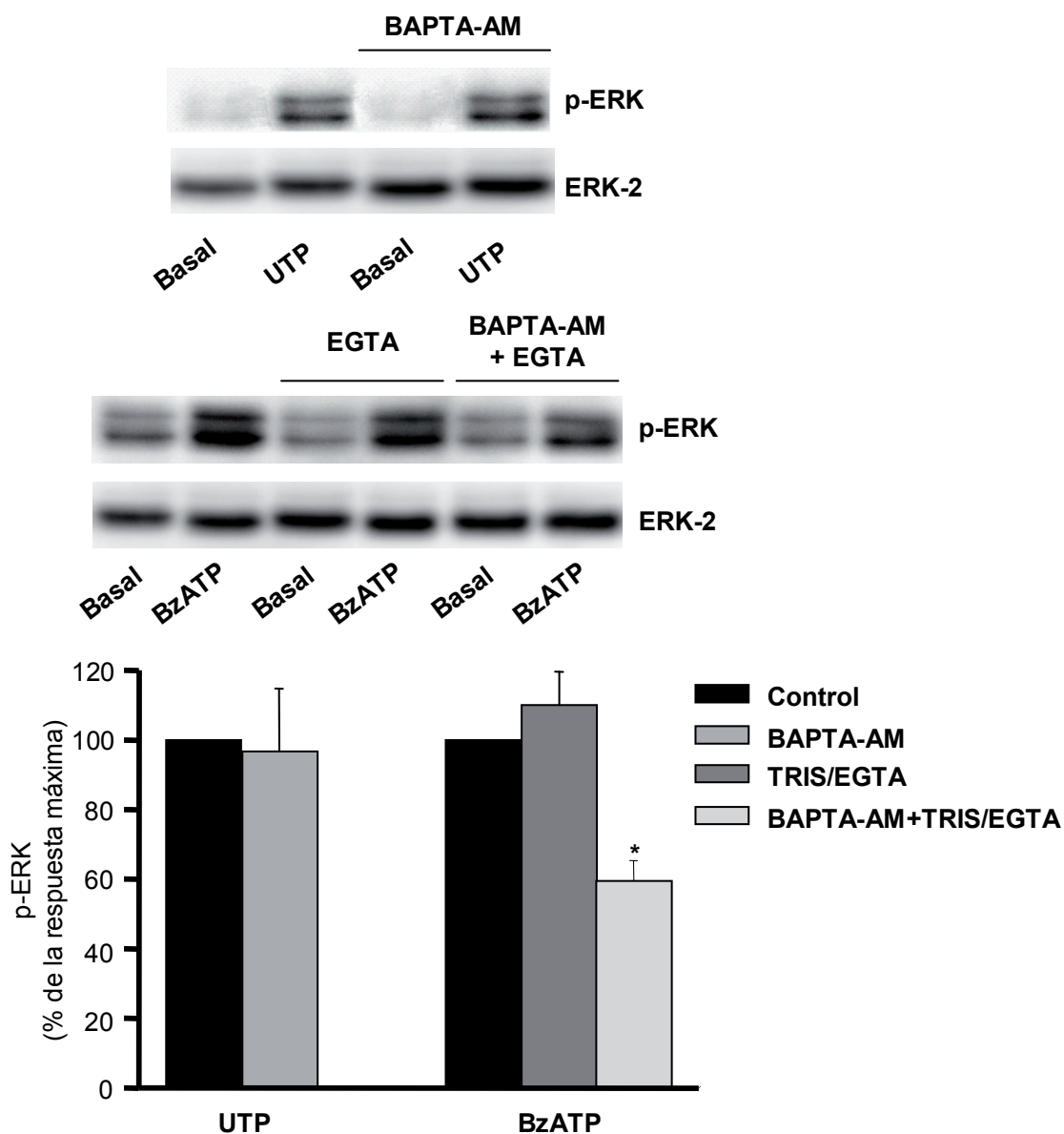


**Figura 76.- Efecto de la preincubación con BBG y PPADS sobre la activación de la proteína ERK inducida por BzATP y UTP.** Los astrocitos se incubaron durante 3 minutos con BBG 1  $\mu$ M o PPADS 30  $\mu$ M antes de su estimulación con BzATP o UTP 100  $\mu$ M. En el panel superior se muestra un experimento tipo de cada experimento. En la gráfica inferior se representan los porcentajes de activación de la proteína ERK respecto a la activación inducida por cada agonista. Cada barra representa la media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos realizados con cultivos diferentes.

Con el objetivo de determinar si el calcio estaba implicado en la activación de las ERK por BzATP o UTP, analizamos el efecto de dos quelantes de calcio, el EGTA, para quelar el calcio extracelular, y el BAPTA-AM, que penetra en las células y se une al calcio intracelular. En la figura 77, se muestra como la fosforilación de la proteína ERK inducida



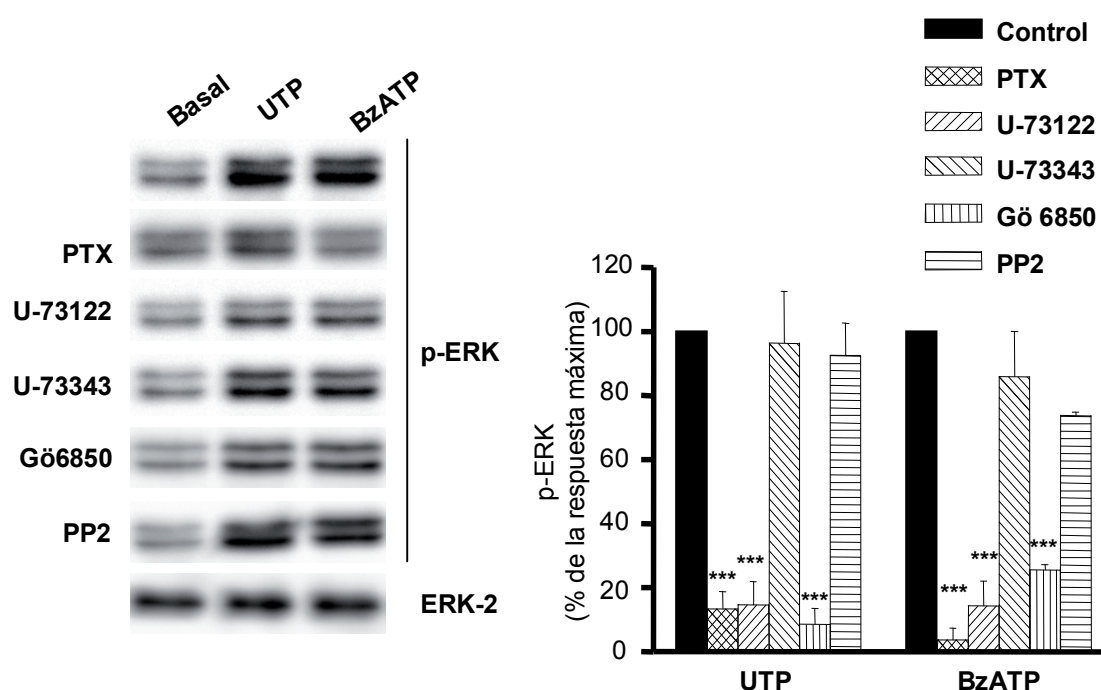
por UTP no se modificó al quelar el calcio intracelular, lo mismo se observó en el caso del BzATP al retirar el calcio extracelular. Sin embargo esta última respuesta si fue reducida al preincubar las células con ambos agentes quelantes. Estos resultados ponen de manifiesto una vez más la capacidad del receptor P2X<sub>7</sub> de activar una señalización metabotrópica.



**Figura 77.- Efecto de la eliminación del calcio en la activación de la proteína ERK inducida por BzATP o UTP.** Las células fueron preincubadas 30 minutos con BAPTA-AM 10  $\mu$ M antes de su estimulación con UTP 100  $\mu$ M. Previamente a la estimulación con BzATP 100  $\mu$ M las células se trataron 5 minutos con una mezcla 1:1 (V/V) de TRIS 1M y EGTA 1M o 30 minutos con BAPTA-AM 10  $\mu$ M, donde se indica 25 minutos antes de que finalizara este último tratamiento se adicionó la mezcla de TRIS y EGTA antes descrita. En el panel superior, se muestran un experimento tipo de cada condición. En el diagrama inferior, están representadas las medias  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos realizados con diferentes cultivos. Los valores se dan en porcentajes de la respuesta inducida por los agonistas.



Para profundizar en el mecanismo por el cual BzATP y UTP activan la cascada de las MAP kinasas estudiamos el efecto de diversos tratamientos sobre la fosforilación de la proteína ERK. Como aparece en la figura 78, el comportamiento de los dos agonistas fue muy similar. En ambos casos la fosforilación de la proteína ERK fue abolida por la preincubación con *toxina pertussis*, lo que indica que el mecanismo de activación ocurre a través de una proteína  $G_{i/o}$ . La respuesta también fue bloqueada por el inhibidor de la fosfolipasa C, U-73122, mientras que apenas se ve afectada por el análogo inactivo, U-73343. El pretratamiento con Gö6850, inhibidor de clásicas y nuevas PKCs redujo casi a niveles basales la fosforilación de las ERK inducida por los dos agonistas. Por el contrario, la respuesta no se vió afectada por PP2, inhibidor de las proteínas src.

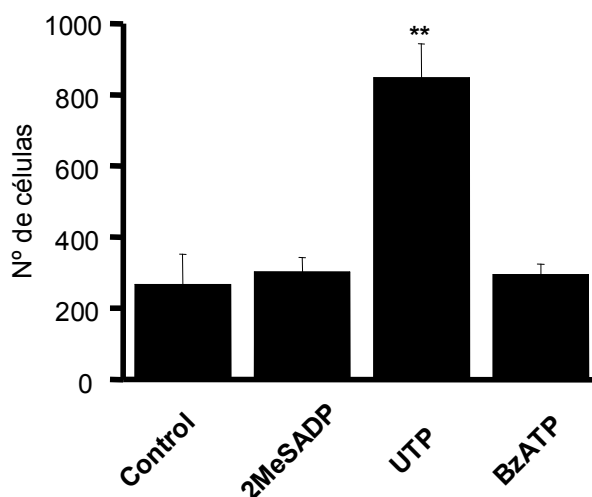


**Figura 78.- Efecto de diferentes tratamientos sobre la fosforilación de la proteína ERK inducida por UTP 100  $\mu$ M o BzATP 100  $\mu$ M.** Antes de la estimulación con los agonistas, las células se preincubaron con los compuestos indicados: 100 ng/mL *toxina pertussis* durante 18 horas, 3  $\mu$ M U-73122 o U-73343 durante 10 minutos, 5  $\mu$ M Gö 6850 durante 20 minutos o 10  $\mu$ M PP2 durante 30 minutos. En el panel superior se muestra un experimento tipo de cada condición. En la gráfica inferior los valores corresponden a la media  $\pm$  SEM de tres experimentos.

#### 2.4.- Análisis de la migración celular inducida por nucleótidos.

Diferentes grupos han demostrado que los receptores P2 están implicados en la migración celular en diversos tejidos. En sistema nervioso, diversos subtipos de receptores P2Y están implicados en procesos quimiotácticos esenciales en la respuesta inmune ejercida

por la microglía y en el desarrollo embrionario del SNC (Honda y cols., 2001; Scemes y cols., 2003). Por ello, decidimos estudiar si 2MeSADP, UTP o BzATP inducían quimiotaxis en los cultivos de astrocitos de cerebelo. Como se observa en la figura 79, solo 100  $\mu$ M UTP provoca un aumento en el número de células que, respecto al control, atraviesan la membrana que separa el medio con nucleótidos del medio en el que inicialmente estaban las células en ausencia de los agonistas purinérgicos.



**Figura 79.- Migración celular inducida por nucleótidos.** Las células se sembraron sobre un inserto de cultivo celular con un diámetro de poro de 0,8  $\mu$ M colocado en un pocillo con DMEM solo o con 10  $\mu$ M 2MeSADP, 100  $\mu$ M UTP o 100  $\mu$ M BzATP. Al día siguiente se llevó a cabo el conteo de las células adheridas a la superficie del inserto que había estado en contacto con los agonistas.





**Discusión**

---



En sus inicios, esta tesis fue planteada como una continuación del trabajo previo del grupo. El objetivo principal era profundizar en el conocimiento y la caracterización de la señalización purinérgica en el modelo de los astrocitos de cerebelo de rata. Partiendo de esta idea, comenzamos a estudiar si estas células expresaban, además del receptor  $P2Y_1$ , algún otro receptor específico de ADP, los receptores  $P2Y_{12}$  y  $P2Y_{13}$ , que habían sido clonados recientemente (Hollopeter y cols., 2001; Zhang y cols., 2001; Communi y cols., 2001b). Además, como consecuencia del descubrimiento de la expresión del receptor  $P2X_7$  en tejidos y tipos celulares no pertenecientes al sistema inmune (Deuchars y cols., 2001; Panenka y cols., 2001; Kukley y cols., 2001), decidimos analizar su expresión en astrocitos, en los que hasta entonces no habíamos detectado la presencia de receptores  $P2X$  funcionales (Jimenez y cols., 2000). Asimismo, quisimos estudiar la señalización acoplada a estos receptores. Para ello, analizamos las respuestas de calcio y la activación de otras cascadas de señalización celular como la ruta de las MAP quinasas y la proteína quinasa D.

## **1.- LOS ASTROCITOS DE CEREBELO DE RATA COEXPRESAN VARIOS SUBTIPOS DE RECEPTORES DE ADP ACOPLADOS A DIFERENTES VÍAS DE SEÑALIZACIÓN.**

En la caracterización previa del receptor  $P2Y_1$  en los astrocitos de cerebelo de rata se había empleado 2MeSATP, considerado entonces el agonista de mayor afinidad para este subtipo de receptor. Sin embargo, este compuesto no activa al receptor  $P2Y_{12}$  y se comporta como agonista parcial o muy débil del receptor  $P2Y_{13}$ . Por ello, decidimos llevar a cabo un nuevo estudio de las respuestas empleando 2MeSADP, un agonista de estos tres subtipos de receptores  $P2Y$ , en combinación con los antagonistas disponibles de los receptores  $P2Y_1$  y  $P2Y_{12}$ .

### **1.1.- Los astrocitos de cerebelo de rata expresan un receptor $P2Y_{13}$ -like acoplado a la inhibición de la adenilato ciclasa a través de una proteína $G_{i/o}$ .**

Los resultados de esta tesis indican que los astrocitos de cerebelo de rata coexpresan dos receptores que pueden ser activados por ADP. El receptor  $P2Y_1$ , ya identificado anteriormente, y un receptor acoplado a proteínas  $G_{i/o}$  que inhibe la producción de AMPc. Mediante experimentos de RT-PCR, se detectó la presencia del mRNA de los dos subtipos de receptores de ADP acoplados negativamente a la adenilato ciclasa, los receptores  $P2Y_{12}$  y  $P2Y_{13}$ . Sin embargo, la presencia del receptor  $P2Y_{12}$  no fue confirmada por experimentos inmunocitoquímicos ni por diferentes ensayos funcionales.

La identificación y diferenciación de los tres subtipos de receptores de ADP en tejidos nativos es bastante compleja, debido a que su perfil de agonistas es bastante similar. Además, aunque se dispone de un antagonista específico del receptor  $P2Y_1$ , el MRS-2179, no existen compuestos fiables que permitan discriminar entre los otros dos subtipos de receptores de ADP. El clopidogrel únicamente se puede utilizar en estudios con animales vivos, ya que

es necesaria su transformación en el hígado para generar el metabolito activo que actúa como antagonista del receptor  $P2Y_{12}$  y ejerce las acciones antitrombóticas. Asimismo, se ha comprobado que los compuestos AR-C, que en principio se consideraron específicos del receptor  $P2Y_{12}$ , también antagonizan al receptor  $P2Y_{13}$ , para el que no existen antagonistas específicos (Palmer y cols., 1998; Hollopeter y cols., 2001; Zhang y cols., 2001; Zhang y cols., 2002; Marteau y cols., 2003; Fumagalli y cols., 2004). Afortunadamente, los diferentes estudios farmacológicos publicados en la literatura, realizados con ambos subtipos de receptores clonados, indican que pueden distinguirse en función de las potencias relativas del ADP y del 2MeSADP. Este último compuesto posee una potencia sobre el receptor  $P2Y_{12}$  dos o tres órdenes de magnitud superior a la del ADP, mientras que para el receptor  $P2Y_{13}$  ambos agonistas son equipotentes (Hollopeter y cols., 2001; Takasaki y cols., 2001; Zhang y cols., 2002; Marteau y cols., 2003). Según las medidas de AMPc realizadas en los astrocitos de cerebelo, en presencia de MRS-2179, ambos agonistas inhiben la activación de la adenilato ciclasa inducida por isoproterenol con una potencia muy similar. Los valores de  $IC_{50}$  están próximos a los descritos por otros autores para el receptor  $P2Y_{13}$  humano y de ratón (Communi y cols., 2001b; Takasaki y cols., 2001; Zhang y cols., 2002; Simon y cols., 2002; Marteau y cols., 2003). Además, (Fumagalli y cols., 2004) han descrito que en rata el ADP es un agonista de este receptor dos o tres veces más potente que el 2MeSADP, como ocurre en nuestro caso. Asimismo, el porcentaje de inhibición máximo observado, un 40% aproximadamente, coincide con el obtenido por diferentes autores, aunque este parámetro apenas presenta diferencias entre los dos subtipos de receptores. Así, para el receptor  $P2Y_{12}$  Hollopeter y cols. (2001) obtuvieron una inhibición máxima del 47% de la producción de AMPc inducida por forskolina al coestimular con  $10 \mu M$  ADP, resultado similar al presentado por otros grupos (Zhang y cols., 2001; Simon y cols., 2002). Como se comentó en el apartado de Resultados, en el caso del receptor  $P2Y_{13}$ , varios grupos han observado que su activación ejerce un efecto bifásico sobre la producción de AMPc. A bajas concentraciones de agonista tiene lugar una inhibición de la adenilato ciclasa. Sin embargo, a concentraciones superiores a  $10 \mu M$  se produce un ligero aumento en la producción de AMPc. Los valores máximos de inhibición descritos en la literatura, obtenidos a concentraciones en el rango del nM, están próximos al 50% (Communi y cols., 2001b; Marteau y cols., 2003).

La inhibición de la producción de AMPc inducida por ADP y 2MeSADP no se modificó al preincubar las células con 2MeSAMP, el único antagonista disponible del receptor  $P2Y_{12}$ . Por todo ello, podemos concluir que el receptor de ADP acoplado a la inhibición de la adenilato ciclasa es un receptor tipo  $P2Y_{13}$ . Por ello, le hemos denominado receptor  $P2Y_{13}$ -like.

### **1.2.- El receptor $P2Y_{13}$ -like activa diferentes cascadas de señalización en los astrocitos de cerebelo de rata.**

La estimulación de los astrocitos con 2MeSADP no solo provoca una disminución de

la producción de AMPc causada por la activación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, si no que también induce la movilización de calcio intracelular. Este incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  parece estar mediado por más de un subtipo de receptor específico de ADP. A bajas concentraciones de agonista parece que el receptor implicado es el receptor  $P2Y_1$ , ya que las respuestas se bloquearon con MRS-2179. Por el contrario, el antagonista no afectó a la movilización de calcio inducida por altas concentraciones de 2MeSADP, sugiriendo que debe estar mediado por otro receptor. El valor de  $EC_{50}$  obtenido en ausencia de MRS-2179 (14 nM) coincide con el descrito por otros grupos tanto para el receptor  $P2Y_1$  (Takasaki y cols., 2001; Sabala y cols., 2001; Boyer y cols., 2002), como para el receptor  $P2Y_{13}$  (Communi y cols., 2001b; Zhang y cols., 2002; Marteau y cols., 2003), mientras que en presencia del antagonista es bastante más elevado (1,44  $\mu$ M). Sin embargo, este último es similar al obtenido por Fumagalli y cols. (2004) para el receptor  $P2Y_{13}$  de rata, expresado en células de astrocitoma 1321N1, para la unión de  $[^3S]GTP\gamma S$  inducida por 2MeSADP ( $EC_{50} = 1,17 \mu$ M). Según estos autores, la  $EC_{50}$  depende del tipo de subunidad  $G\alpha$  presente en las células. Cuando se coexpresa el receptor  $P2Y_{13}$  con subunidades  $G\alpha_{16}$  el valor de  $EC_{50}$  se reduce aproximadamente a la mitad, es decir, se incrementa la potencia del agonista. Por tanto, el acoplamiento a diferentes proteínas G con distinta eficacia puede explicar la discrepancia entre los valores de  $EC_{50}$  obtenidos en los experimentos de medida de AMPc y los ensayos de calcio, ya que ambas respuestas presentan distinta sensibilidad a *toxina pertussis*.

El MRS-2179 es un antagonista competitivo del receptor  $P2Y_1$ , por ello, se podría pensar que se estaba produciendo un desplazamiento de la unión del antagonista por el agonista. Sin embargo, este fenómeno es bastante improbable ya que, en primer lugar, todos los experimentos se han realizado preincubando las células con MRS-2179 antes de la estimulación con 2MeSADP, por tanto, todos los sitios de unión estarían inicialmente ocupados por el antagonista. En segundo lugar, si se produjera un desplazamiento, éste tendría lugar con todas las técnicas empleadas, y en el caso de las medidas de AMPc y de activación de las ERKs, se observan respuestas significativas en presencia del antagonista cuando las células se estimulan con 2MeSADP 100 nM. Además, incluso empleando concentraciones de MRS-2179 superiores, hasta 100  $\mu$ M, se sigue observando un incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  al estimular las células con 10  $\mu$ M 2MeSADP. Los estudios de unión de radioligandos demuestran que el valor de  $IC_{50}$  para la inhibición de la unión de 5 nM MRS-2179 por 2MeSADP es superior a 100 nM. Según estos ensayos, el  $t_{1/2}$  de la disociación inducida por 10  $\mu$ M 2MeSADP, para 5 nM de MRS-2279, un compuesto de la misma familia, estructura y valor de  $K_i$  similar al del MRS-2179, es de 1,5 minutos, lográndose la disociación completa a los 10-15 minutos (Boyer y cols., 1998; Waldo y cols., 2002). Teniendo en cuenta que la concentración de antagonista y agonista empleada en nuestros experimentos es la misma, 10  $\mu$ M, que las respuestas de calcio inducidas por 2MeSADP comienzan a los pocos segundos de adicionarse el agonista y que los niveles basales se recuperan antes de 1,5 minutos de incubación, puede descartarse que el 2MeSADP desplace de su sitio de unión al MRS-2179



permitiendo la activación del receptor  $P2Y_1$  en dichas condiciones.

No existen evidencias que indiquen que el receptor  $P2Y_{12}$  induzca la movilización de calcio, es más, en todos los modelos celulares, como plaquetas y células C6 glioma, donde este receptor se coexpresa con el receptor  $P2Y_1$ , se observa que cada subtipo modula exclusivamente una cascada de señalización. El receptor  $P2Y_1$  induce la movilización de calcio y el receptor  $P2Y_{12}$  la inhibición de la adenilato ciclasa (Czajkowski y cols., 2002; Baurand y cols., 2005). La participación de este último receptor en la activación de la PLC en los astrocitos fue excluida al no observarse efecto de su antagonista 2MeSAMP.

Por tanto, el receptor  $P2Y_{13}$ -like es el candidato más probable para mediar las respuestas de calcio inducidas por altas concentraciones de agonista. La distribución de este receptor, al contrario que la del receptor  $P2Y_1$ , no es homogénea en toda la población de astrocitos, ya que pueden distinguirse varias poblaciones celulares con diferente sensibilidad al MRS-2179, existiendo un 13% de los astrocitos que parecen no expresar este receptor, al menos de manera funcional.

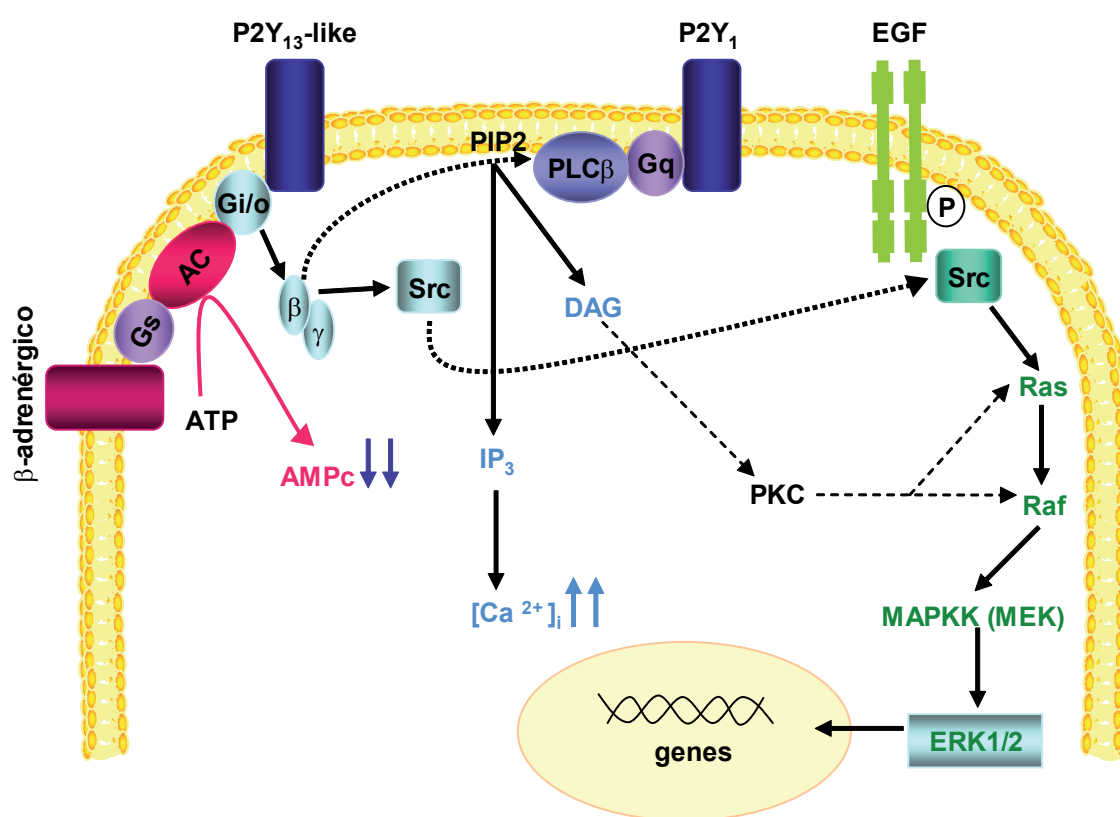
En este trabajo hemos demostrado que el receptor  $P2Y_{13}$ -like puede activar la vía de las ERKs. La estimulación de los astrocitos con 2MeSADP induce la fosforilación de dichas proteínas. Los valores de  $EC_{50}$  obtenidos tanto en presencia como en ausencia de MRS-2179 son del mismo orden de magnitud y están próximos al observado en los ensayos de determinación de AMPc. Del mismo modo, ambas cascadas de señalización están mediadas por proteínas G sensibles a *toxina pertussis*.

### 1.2.1.- Cascada de activación de las proteínas ERKs por 2MeSADP.

Como se comentó en el apartado de la Introducción, los receptores GPCRs pueden activar la cascada de las MAP quinasas mediante vías muy heterogéneas (van Biesen y cols., 1996b 2007). No es infrecuente que un mismo receptor se acople a diferentes tipos de proteínas G. Esto puede ocurrir en diferentes tipos celulares, por ejemplo, el receptor muscarínico tipo 1 de acetilcolina actúa vía  $G_q$  en las células COS-7, mientras que en las células CHO, su señalización transcurre a través de proteínas  $G_o$  (Hawes y cols., 1995; van Biesen y cols., 1996a). Pero este acoplamiento a distintas proteínas G también puede tener lugar dentro de la misma célula. La activación de las MAP quinasas por el receptor de bradiquinina requiere la activación de dos rutas independientes, una dependiente de proteínas  $G_q$  y la otra de proteínas  $G_i$  (Blaukat y cols., 2000). Que tenga lugar un mecanismo u otro depende del microentorno celular, ya que como demuestran la mayoría de los estudios, la señalización de un receptor es “tejido específica”.

En nuestro modelo celular, los astrocitos de cerebelo de rata, la activación de las proteínas ERKs inducidas por 2MeSADP requiere la participación de una proteína  $G_{i/o}$ , de alguna isoforma de PKC dependiente de DAG y de la activación de proteínas tirosina quinasas citosólicas de la familia Src quinasas, como pone de manifiesto la sensibilidad a *toxina pertussis*, al tratamiento prolongado con esteres de forbol y a PP2. La figura 80 muestra un esquema de la cascada de señalización intracelular que podría

activarse tras la estimulación del receptor  $P2Y_{13}$ -like. Las subunidades  $G_{\beta\gamma}$ , liberadas de las proteínas  $G_i$ , interaccionarían con las proteínas Src, que a su vez pueden fosforilar a la proteína adaptadora Shc, induciendo el reclutamiento de Grb2 y Sos a la membrana y la activación de ras. Este mecanismo sería similar al descrito para la activación de las ERKs inducida por el dinucleótido  $Ap_5A$ , aunque en este último caso, la proteína G implicada es insensible a la *toxina pertussis* (Jimenez y cols., 2002; Delicado y cols., 2005). Otra posible diana de las subunidades  $G_{\beta\gamma}$  es la PLC. Tras su estimulación tendría lugar un incremento de los niveles de DAG en la membrana y la activación de alguna isoforma de PKC, dependiente de DAG e insensible a calcio, que podría activar a las proteínas Src, convergiendo con la cascada de los receptores tirosina quinasa (Shah y Catt, 2002).



**Figura 80.- Activación de las proteínas ERKs por 2MeSADP en los astrocitos de cerebelo.**

La activación de las proteínas ERKs por el receptor  $P2Y_{13}$ -like está mediada por una proteína  $G_{i/o}$ . Las subunidades  $G_{\beta\gamma}$  liberadas de las proteínas  $G_i$  pueden activar a las proteínas Src, convergiendo con la cascada de activación de las MAPKs por los receptores de factores de crecimiento. Las proteínas Src también pueden ser fosforiladas por PKCs independientes de calcio, activadas por el DAG generado por la  $PLC\beta$ , que a su vez puede ser activada por las subunidades  $G_{\beta\gamma}$ .

Las subunidades  $G_{\beta\gamma}$  pueden activar otras enzimas responsables de la fosforilación

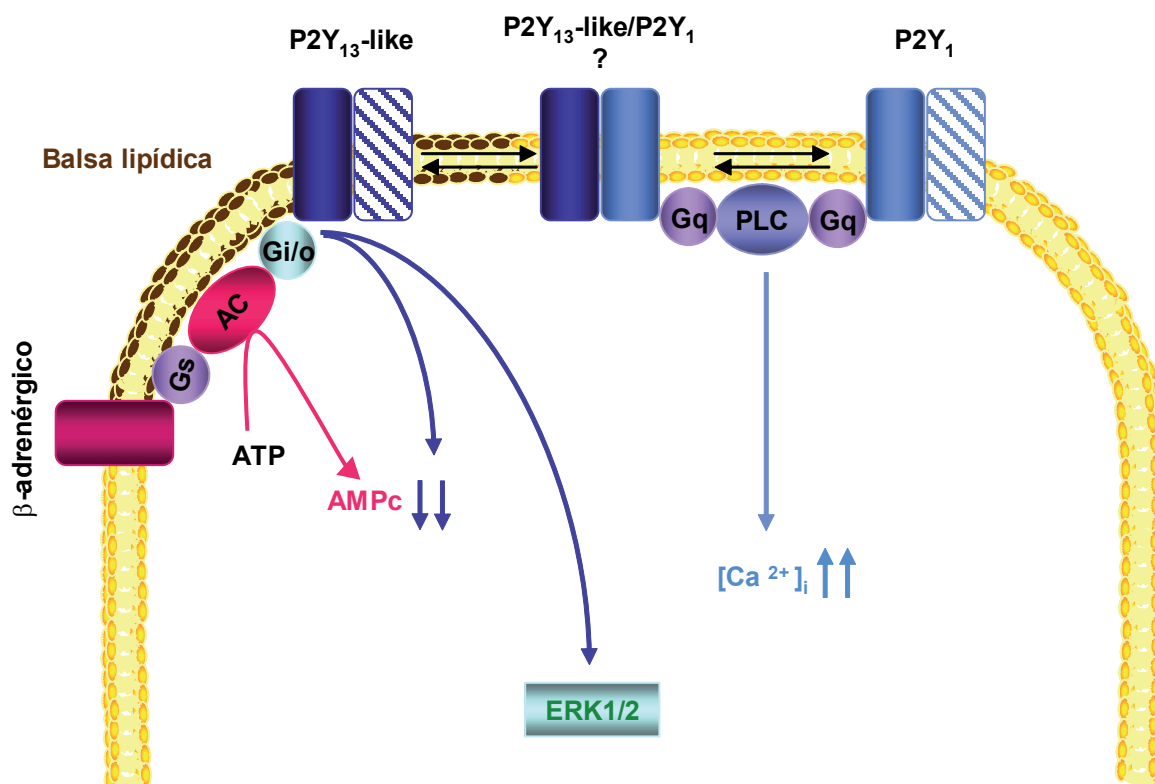
de las tirosinas quinasas citosólicas, por ejemplo, la PI3K $\gamma$  (Hawes y cols., 1996; Luttrell y cols., 1997). En los astrocitos de cerebelo de rata, esta vía no parecer estar implicada, ya que la activación de las ERKs inducida por 2MeSADP es insensible a inhibidores de la PI3K, como son la wortmanina y el LY 294002. Sin embargo, la PI3K si que forma parte de la cascada de señalización intracelular activadas por el receptor P2Y<sub>13</sub>-like en las neuronas granulares de cerebelo de rata. Ambos inhibidores bloquean la activación de las ERKs y la fosforilación de la GSK3 inducida por 2MeSADP (Ortega y cols., 2008). Este es otro ejemplo que confirma que la señalización de un receptor depende del tipo y microentorno celular, lo que le permite ejercer una función determinada en cada localización.

### **1.3.- Posible segregación de los receptores de ADP en dominios específicos de la membrana plasmática.**

Los resultados obtenidos al analizar las diferentes vías de señalización que se activan al estimular los astrocitos de cerebelo con 2MeSADP, en presencia y ausencia de del antagonista del receptor P2Y<sub>1</sub>, el MRS-2179, son compatibles con la segregación de los receptores de ADP presentes en los astrocitos de cerebelo, receptores P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>13</sub>-like, en diferentes dominios de la membrana plasmática. Dicha separación espacial ha sido postulada por diferentes autores para los receptores P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>12</sub> en plaquetas y otros modelos celulares (Quinton y cols., 2005; Savi y cols., 2006; Vial y cols., 2006).

El receptor P2Y<sub>13</sub>, al igual que el receptor P2Y<sub>12</sub> y a diferencia del receptor P2Y<sub>1</sub>, estaría localizado en regiones de la membrana rica en lípidos de baja densidad, denominadas balsas lipídicas. Estos dominios sirven de lugar de anclaje a numerosas proteínas, entre las que se encuentran proteínas G<sub>i</sub> y proteínas tirosina quinasas citosólicas, familia a la que pertenecen las proteínas Src, que participan en la señalización del receptor P2Y<sub>13</sub> (Simons y Toomre, 2000; Oh y Schnitzer, 2001; Pike, 2003). Tenemos resultados preliminares que apoyan la hipótesis. La depleción del colesterol, mediante el tratamiento con metil- $\beta$ -ciclodextrina, elimina totalmente la activación de las proteínas ERKs.

Recientemente Choi y cols. (2008) han descrito que el receptor P2Y<sub>1</sub> puede formar heterodímeros funcionales con el receptor P2Y<sub>11</sub>. En base a esto, podemos proponer un modelo (figura 81), según el cual las respuestas de calcio inducidas por 2MeSADP estarían mediadas por un heterodímero P2Y<sub>1</sub>/P2Y<sub>13</sub> localizado fuera de las balsas lipídicas y acoplado preferentemente a proteínas G<sub>q</sub>. Este modelo explicaría las diferencias de los valores de EC<sub>50</sub> observadas en presencia y ausencia de MRS-2179. En presencia del antagonista se impediría la formación de este heterodímero, favoreciéndose la señalización mediada por proteínas G<sub>i</sub> que se traduciría en una disminución del valor de EC<sub>50</sub> para la activación de las ERKs. Por el contrario, se requerirían concentraciones más elevadas de agonista para inducir la movilización de calcio intracelular mediante el acoplamiento del receptor P2Y<sub>13</sub>-like a proteínas G<sub>q</sub>.



**Figura 81.- Modelo propuesto para la activación de diferentes cascadas de señalización por los receptores de ADP.** El 2MeSADP interacciona con los receptores  $P2Y_1$  y  $P2Y_{13}$ -like y activa diferentes cascadas de señalización. Es posible que ambos receptores formen un heterodímero responsable de la movilización de calcio intracelular. Este heterodímero estaría localizado fuera de las regiones de membrana ricas en lípidos de baja densidad, denominadas balsas lipídicas, y se acoplaría principalmente a una proteína  $G_q$ . Sin embargo, el resto de la señalización, mediada por proteínas  $G_i$ , sería activada por el receptor  $P2Y_{13}$ -like localizado en las balsas lipídicas, donde podría adoptar una conformación monomérica u homodimérica. No se puede descartar que exista un flujo del receptor desde las balsas lipídicas al exterior de dichos dominios. El receptor  $P2Y_1$ , situado fuera de las balsas lipídicas, no sabemos si en forma monomérica u homodimérica, también induciría la movilización de calcio a través de una proteína  $G_q$ .

En este caso, al contrario de lo que ocurre con los heterodímeros  $P2Y_1/P2Y_{11}$ , la dimerización de los receptores  $P2Y_1$  y  $P2Y_{13}$ -like favorece la estabilización de este último en la membrana. La necesidad del receptor  $P2Y_{13}$ -like de interaccionar con el receptor  $P2Y_1$  podría explicar porque, al transfectar las células de astrocitoma 1321N1 con ambos receptores, se obtuvo un mayor número de clones positivos y un mayor porcentaje de inhibición de la producción de AMPc que al transfectar únicamente con el receptor  $P2Y_{13}$ . Para confirmar esta hipótesis, se requiere la realización de nuevos experimentos, tanto con astrocitos como con las células establemente transfectadas. Además, la comparación de los datos obtenidos en ambos modelos así como con células que coexpresan los receptores  $P2Y_1$  y  $P2Y_{12}$ , cuyo

proceso de obtención ya se ha iniciado durante el periodo de estancia en el laboratorio del Dr. Christian Gachet, nos ayudará a conocer mejor las vías de señalización mediadas por los receptores de ADP en los astrocitos. Asimismo, estos ensayos nos permitirán confirmar si efectivamente, tal y como se deduce a partir de los resultados descritos en los apartados anteriores, es el receptor P2Y<sub>13</sub>, y no el receptor P2Y<sub>12</sub>, el que se está coexpresando con el receptor P2Y<sub>1</sub> en este tipo de células gliales.

Tampoco se puede descartar que exista algún tipo de interacción entre las distintas cascadas de señalización activadas por los receptores P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>13</sub>-like, tal y como se ha descrito para los receptores P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>12</sub> en plaquetas (Hardy y cols., 2004).

## **2.- LOS ASTROCITOS DE CEREBELO DE RATA EXPRESAN UN RECEPTOR P2X<sub>7</sub>-LIKE CON CARACTERÍSTICAS MUY PECULIARES**

Los astrocitos de cerebelo *a priori* presentaban algunas ventajas para abordar el estudio del receptor P2X<sub>7</sub>. En trabajos anteriores habíamos demostrado que estas células gliales no poseían receptores de nucleótidos ionotrópicos funcionales que pudiesen ser dianas del BzATP, el agonista ampliamente utilizado en la caracterización de este subtipo de receptor, ni tampoco el receptor metabotrópico P2Y<sub>11</sub>. Si bien, expresaban una gran variedad de receptores metabotrópicos de nucleótidos, con los que podría existir algún tipo de interacción (Jimenez y cols., 2000). Utilizando diferentes aproximaciones experimentales, hemos demostrado que los astrocitos de cerebelo de rata, tras ser estimulados con BzATP, exhiben una serie de respuestas que no se reproducen con ningún otro nucleótido, ni siquiera con el agonista fisiológico ATP. Estas respuestas parecen estar mediadas por un receptor específico tipo P2X<sub>7</sub>-like, expresado prácticamente en toda la población celular. La expresión de este receptor no es un artefacto del cultivo. Los astrocitos en cultivo primario, 2-4 días en cultivo, responden a estimulaciones con BzATP igual que aquellos que se mantienen durante 12-13 días en cultivo.

El receptor P2X<sub>7</sub>-like de los astrocitos de cerebelo de rata presenta dos peculiaridades. En primer lugar, su activación prolongada induce una serie de cambios morfológicos, sin desencadenar la muerte celular. La segunda característica distintiva es que este receptor presenta una señalización dual, metabotrópica e ionotrópica, en la mayoría de las células. El hecho de que las respuestas a BzATP no se reproduzcan con ATP, sugiere que debe existir una interacción con alguno de los receptores metabotrópicos.

El receptor P2X<sub>7</sub> se identificó inicialmente como el antiguo P2Z, un receptor de muerte celular considerado exclusivo de macrófagos y otras células del sistema inmune, donde su activación desencadena procesos apoptóticos. La muerte celular va precedida de cambios morfológicos y de la aparición de un poro citolítico (Surprenant y cols., 1996; Bulanova y cols., 2005). Sin embargo, en los últimos años se ha detectado en otros tipos celulares donde, lejos de inducir muerte celular, podría estar mediando funciones tan dispares como neurotransmisión o proliferación (Solini y cols., 1999; Deuchars y cols., 2001; Hervas

y cols., 2003; Miras-Portugal y cols., 2003; Adinolfi y cols., 2005; Zhang y cols., 2005; Raffaghello y cols., 2006). En el caso de los astrocitos de cerebelo, la estimulación del receptor P2X<sub>7</sub>-like produce una serie de cambios morfológicos que no van acompañados ni de la formación del poro citolítico, ni de muerte celular, como se deduce de los ensayos de viabilidad celular y de las medidas de la entrada de la sonda fluorescente Yo-Pro-1. Por tanto los astrocitos cerebelosos de rata constituyen otro tipo celular en los que el receptor P2X<sub>7</sub> parece haber silenciado su actividad preapoptótica (Solini y cols., 1999; Adinolfi y cols., 2005; Zhang y cols., 2005; Raffaghello y cols., 2006).

### **2.1.- El receptor P2X<sub>7</sub>-like en los astrocitos de cerebelo activa cascadas de señalización metabotrópicas e ionotrópicas.**

Como se ha comentado, la caracterización de los receptores de nucleótidos nativos es bastante compleja, debido a la escasez de buenas herramientas farmacológicas que discriminen entre los diferentes subtipos de receptores. Esta complejidad es todavía mayor en el caso del receptor P2X<sub>7</sub>, debido a que una de las propiedades más utilizada para su caracterización, la formación del poro “citólítico”, no tiene lugar en todos los tejidos. Además, se ha demostrado que los poros que aparecen en la membrana no se originan por la dilatación del receptor, sino que es necesaria la participación de otras proteínas (Pelegrin y Surprenant, 2006; Pelegrin y Surprenant, 2007). En el estudio del receptor P2X<sub>7</sub>-like, hemos seguido los criterios farmacológicos, plenamente aceptados, que se deben cumplir para poder afirmar que una determinada respuesta está mediada por este receptor. Son los siguientes: 1) que presente selectividad por el agonista BzATP, en el caso del receptor de rata el valor de EC<sub>50</sub> descrito es de 15-20 μM, 2) que sea sensible al bloqueo reversible por los antagonistas Brilliant Blue G (10-100 nM) y a PPADS (concentraciones micromolares) y 3) que se module por la presencia de cationes divalentes en el medio extracelular.

Para llevar a cabo la caracterización farmacológica del receptor P2X<sub>7</sub> en los astrocitos de cerebelo, hemos analizado una de las primeras etapas de la señalización del receptor, la entrada de calcio al interior celular. Prácticamente todas las células ensayadas respondieron a BzATP con señales intracelulares de calcio que no se desensibilizaban en presencia continua del agonista. Este comportamiento coincide con el descrito para el receptor P2X<sub>7</sub>, cuya respuesta no se desensibiliza sino que se incrementa a lo largo del tiempo de estimulación o tras estimulaciones sucesivas con el agonista (North, 2002). En la mayoría de las células se observaron respuestas de calcio que presentaban dos componentes bien diferenciados, un primer componente transitorio y otro más tardío. Este último era sostenido, de magnitud variable y se mantenía durante todo el tiempo de estimulación con el agonista. Los dos componentes difieren claramente en su naturaleza, sensibilidad a los antagonistas y en la modulación por cationes divalentes. En contra de lo esperado para un receptor ionotrópico, el componente transitorio inicial era mayoritariamente de naturaleza metabotrópica. Se mantenía en ausencia de calcio extracelular y se bloqueaba por el pretratamiento con el



inhibidor de la fosfolipasa C, el U-73122. Este comportamiento indica que el calcio citosólico procedía de reservorios intracelulares como consecuencia de la activación de la fosfolipasa C y la producción de  $IP_3$ . La proteína G implicada era insensible a toxina pertussis. El segundo componente era de naturaleza ionotrópica, puesto que se eliminaba tras la retirada del calcio del medio extracelular. Su sensibilidad a los antagonistas BBG y PPADS sugiere que la entrada de calcio se produce a través del receptor  $P2X_7$  (Chessell y cols., 1998; Jiang y cols., 2000b; Suadicani y cols., 2006). Este componente no se modificó por el tratamiento con el U-73122 ni con su análogo inactivo, U-73343, descartándose así que estos compuestos estén actuando como antagonistas del receptor  $P2X_7$  como han propuesto otros autores (Takenouchi y cols., 2005). La participación de un receptor  $P2X_7$ -like también está avalada por la modulación de la respuesta por los cationes divalentes presentes en el medio extracelular, los iones  $Mg^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ , que inhiben las respuestas del receptor  $P2X_7$  (Virginio y cols., 1997). La retirada de los iones  $Mg^{2+}$  del medio de extracelular incrementó el componente ionotrópico de las respuestas de calcio, y el efecto contrario se observó al aumentar la concentración de este catión o al incluir  $Zn^{2+}$  en el medio de estimulación. El componente inicial transitorio se abolió completamente con PPADS, mientras que únicamente se bloqueó un 30% con BBG. Por tanto, el receptor  $P2X_7$ -like en los astrocitos de cerebelo de rata presenta actividad metabotrópica e ionotrópica en la misma célula. La primera es responsable de la activación de la fosfolipasa C y la movilización de calcio de los depósitos intracelulares. La segunda está implicada en la entrada de calcio extracelular a través del propio receptor. Esta señalización dual no se ha observado en ningún otro tipo celular, todas las respuestas de calcio inducidas tras la estimulación del receptor  $P2X_7$  se eliminan en ausencia de calcio extracelular (Solini y cols., 1999; Parvathenani y cols., 2003; Hervas y cols., 2005). No obstante, no es el primer ejemplo de receptor ionotrópico que interacciona con proteínas G y presenta una señalización metabotrópica. Existen varios ejemplos de este fenómeno en la literatura, por ejemplo el receptor nicotínico de acetilcolina y el receptor de AMPA, un tipo de receptor ionotrópico de glutamato (Giovannelli y cols., 1991; Sorenson y Gallagher, 1996; Wang y cols., 1997).

Uno de los casos más interesante es el receptor de kainato, otro subtipo de receptor ionotrópico de glutamato, de las neuronas del ganglio dorsal de rata. Su estimulación inhibe la liberación de GABA mediante un mecanismo que implica la activación de la hidrólisis de los lípidos de inositol por la PLC a través de una proteína  $G_i$  (Rodríguez-Moreno y Lerma, 1998). En este caso, la actividad metabotrópica e ionotrópica están segregadas en diferentes localizaciones celulares y son independientes (Rozas y cols., 2003). En los astrocitos de cerebelo, ambas vías de señalización coexisten en la misma célula, aunque difieren en sus cinéticas de activación, de manera que la señalización metabotrópica precede a la ionotrópica. Sólo un porcentaje muy pequeño de células exhibieron respuestas de calcio con un único componente ( $\leq 15\%$ ), principalmente el componente ionotrópico. Centrándonos en estas últimas, comprobamos que todas presentaban una cinética de activación muy lenta, se requerían

al menos 60 segundos de estimulación con el agonista para desencadenar la respuesta. Estos resultados han sido confirmados mediante experimentos de electrofisiología, como puede comprobarse en el manuscrito que acompaña a esta tesis doctoral. Dichos periodos de tiempo son excesivamente largos para tratarse de un receptor ionotrópico. Sin embargo, en otras preparaciones también se han descrito cinéticas lentas de activación del receptor P2X<sub>7</sub>. Así, en las células acinares de la glándula parótida, cuando se realiza la primera aplicación del agonista, se requieren aplicaciones de 2,5 minutos de ATP para desencadenar las respuestas de calcio. En las mismas condiciones experimentales, estimulaciones posteriores inducen una respuesta mucho más rápida, similares a las que presentan las células de los conductos (Li y cols., 2003). Los autores sugieren que estas cinéticas tan diferentes podrían deberse a la existencia de distintas conformaciones del receptor P2X<sub>7</sub>. En las células acinares, el receptor estaría en la membrana en forma de monómeros inactivos, cuyo coensamblaje, para formar el receptor ionotrópico funcional, tendría lugar tras la exposición al agonista. Por el contrario, en las células de los conductos, el receptor ya estaría en forma de oligómeros activos, preparados para su activación. Por tanto, es posible que en los astrocitos de cerebelo ocurra algo similar a lo descrito en las glándulas salivares (figura 82). De este modo, la forma monomérica activaría la cascada metabotrópica de la hidrólisis de los lípidos de inositol e induciría la activación de las proteínas ERKs. Los valores de EC<sub>50</sub> obtenidos para las dos respuestas son muy similares entre sí y coinciden con el descrito para el receptor P2X<sub>7</sub> de rata (Jiang y cols., 2000b). La forma oligomérica presentaría actividad ionotrópica. Como se comentará más adelante, tanto la forma monomérica como la oligomérica pueden estar implicadas en la activación de la PKD. La existencia de una forma monomérica del receptor P2X<sub>7</sub> en células gliales de hipocampo y cerebelo ya ha sido sugerida por otros autores (Kim y cols., 2001b).

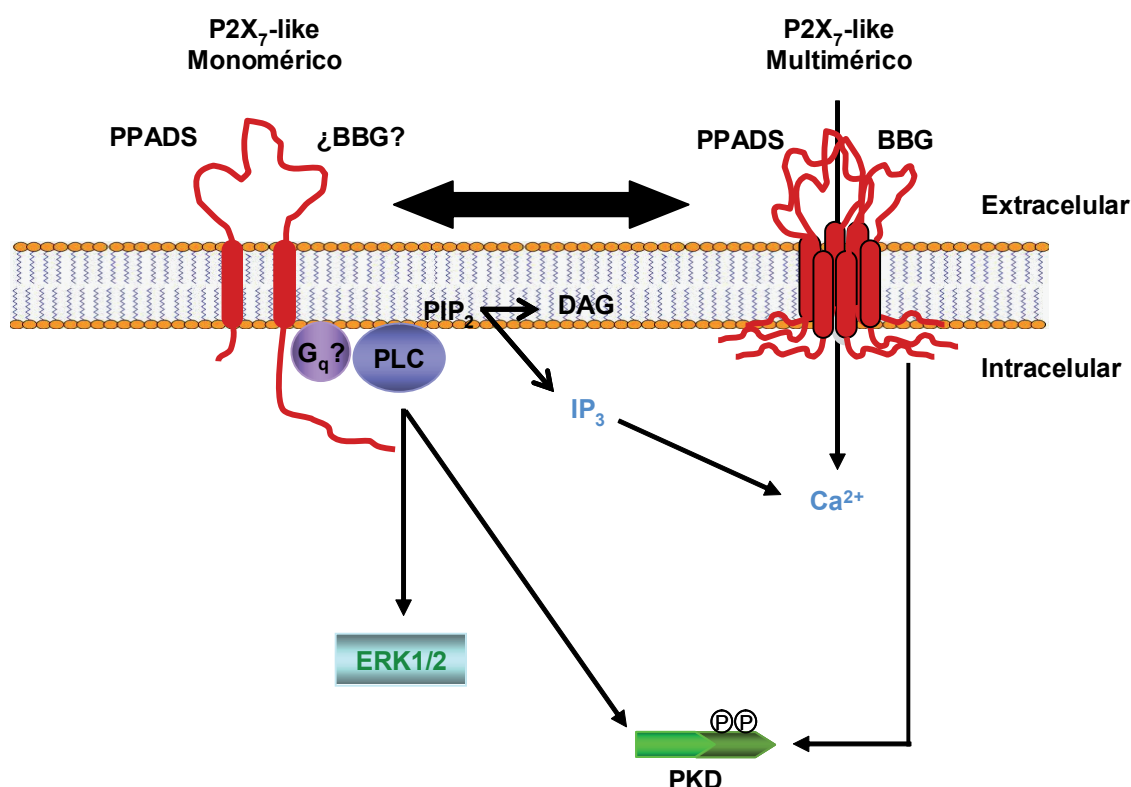
Según el modelo propuesto, el BBG únicamente interaccionaría con la forma oligomérica bloqueando la actividad del canal, mientras que el PPADS interaccionaría con las dos formas del receptor. De este modo, el pequeño porcentaje del primer componente transitorio de las respuestas de calcio sensible a BBG, un 30%, que es idéntico al que se bloqueó por alto Mg<sup>2+</sup>, podría ser ionotrópico y estaría mediado por los pocos receptores que se encuentran ya coensamblados en la membrana. Teniendo en cuenta que algunos sitios de unión de los cationes divalentes se encuentran en la interfase de las subunidades P2X que forman el canal o interaccionan con residuos de las diferentes subunidades (Nagaya y cols., 2005; Acuna-Castillo y cols., 2007), otra posibilidad es que el Mg<sup>2+</sup> y el BBG se unan con menos afinidad a la forma monomérica y no bloqueen por completo su actividad.

El modelo no excluye que se pueda tratar de un heterómero formado por subunidades P2X<sub>7</sub>/P2X<sub>4</sub> (Guo y cols., 2007). Las proteínas de las subunidades P2X<sub>4</sub> también se han detectado por inmunocitoquímica y, aunque el receptor P2X<sub>4</sub> homomérico es insensible a PPADS, el perfil farmacológico del heterómero puede ser diferente (Soto y cols., 1996). No deja de ser una mera especulación, pero la presencia de este heterómero podría explicar



por qué el efecto de los iones  $Zn^{2+}$  sobre ambos componentes de las respuestas de calcio es menor que el observado con alto  $Mg^{2+}$ . La inhibición producida sobre las subunidades  $P2X_7$ , se compensaría con la potenciación sobre las subunidades  $P2X_4$ .

Tampoco se puede descartar que el receptor  $P2X_7$ -like esté interaccionado, a través de su extremo C-terminal, con un receptor metabotrópico todavía no identificado, tal y como ocurre con el receptor ionotrópico  $GABA_A$  y el receptor metabotrópico de dopamina D5 o entre el receptor ionotrópico de NMDA y el receptor de dopamina D1 (Liu y cols., 2000; Lee y cols., 2002).



**Figura 82.- Modelo propuesto para el ensamblaje en la membrana del receptor  $P2X_7$ .** El receptor  $P2X_7$  podría existir en dos conformaciones. Una forma monomérica sería responsable de la movilización de los reservorios de calcio intracelular, de la activación de las ERKs y parcialmente de la activación de PKD. También existiría una conformación oligomérica con actividad de canal iónico e implicada también en la activación de PKD. La forma oligomérica sería sensible tanto a PPADS como a BBG, mientras que la forma monomérica sería totalmente sensible a PPADS y prácticamente insensible a BBG.

## 2.2.- Los receptores $P2X_7$ -like y $P2Y_2$ activan la cascada de las proteínas ERKs a través de una proteína $G_{i/o}$ .

Como ya se ha comentado, en la señalización metabotrópica del receptor  $P2X_7$ -like también están implicadas las proteínas ERKs. Al igual que ocurría con las respuestas de

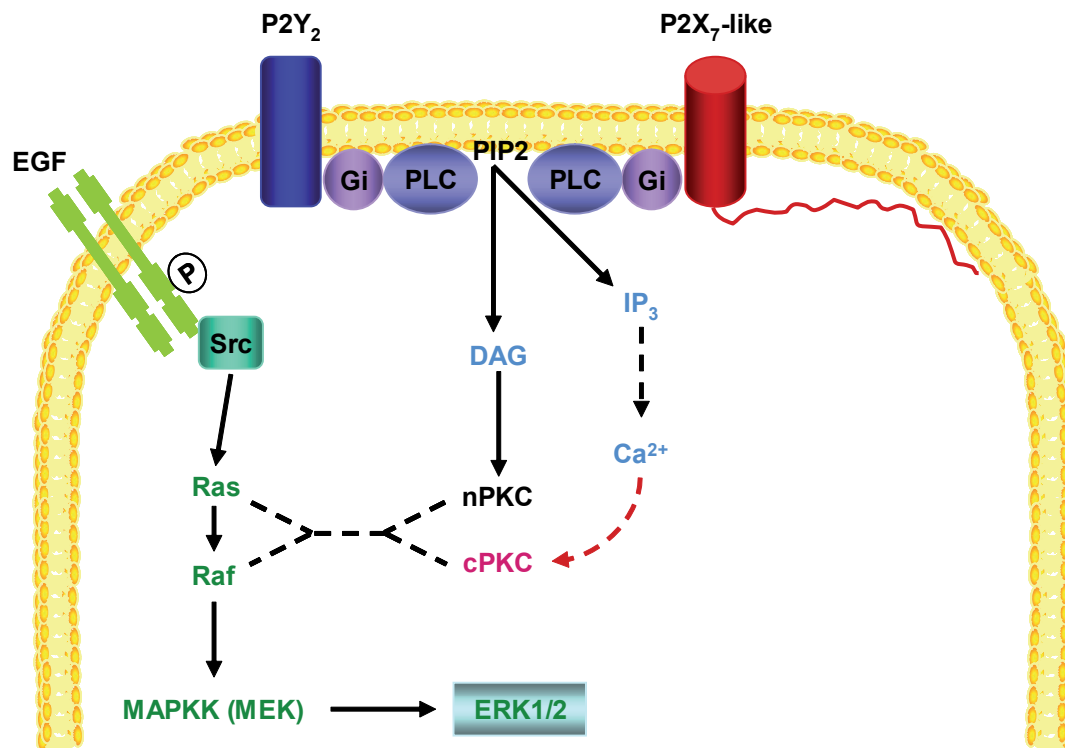
calcio, la activación de esta ruta de señalización por BzATP fue bloqueada por completo por el PPADS, que no modificó el efecto del UTP o del ATP. Esto indica que los dos últimos agonistas actúan sobre otro receptor, el receptor  $P2Y_2$  insensible a PPADS.

Al igual que ocurría con el 2MeSADP, la activación de la cascada de las MAPKs por UTP y BzATP está mediada por proteínas  $G_{i/o}$ . Sin embargo, existen diferencias entre los mecanismos implicados. En el caso del 2MeSADP la respuesta era más transitoria ya que los niveles basales prácticamente se habían recuperado a la media hora de estimulación. Por el contrario, los niveles de fosforilación de las proteínas ERKs tras 30 minutos de estimulación con BzATP o UTP se mantenían alrededor del 60% de la fosforilación máxima. Asimismo, en la activación por 2MeSADP están implicadas las proteínas Src, mientras que en la respuesta a los otros dos nucleótidos dichas proteínas no están involucradas.

De forma general, parece que los receptores  $P2X_7$  y  $P2Y_2$  activan esta cascada mediante mecanismos similares (figura 83). Cabe esperar que exista alguna diferencia en el subtipo de PKC implicado en la respuesta a ambos agonistas. En el caso del BzATP, la activación de estas MAPKs es parcialmente sensible al quelante de calcio BAPTA-AM, que atraviesa la membrana plasmática y puede unirse al calcio intracelular. Asimismo, la sensibilidad al Gö6850 es ligeramente inferior a la observada en la respuesta a UTP. Por tanto, es posible que en ambos casos la activación de las ERKs dependa principalmente de nPKCs, pero que en el caso del receptor  $P2X_7$ -like también este implicada algún subtipo de PKC clásica.

Se han descrito numerosos mecanismos por los cuales los receptores  $P2Y$  activan la cascada de las ERKs a través de diferentes efectores (Lenz y cols., 2000). El grupo del Dr. Soltoff ha propuesto una vía de activación para el receptor  $P2Y_2$  dependiente de la movilización de calcio intracelular y de las proteínas Src (Soltoff y cols., 1998). Esta ruta puede ser descartada en los astrocitos de cerebelo ya que la fosforilación de las ERKs inducida por UTP no se bloqueó por la preincubación con BAPTA-AM o con PP2. Respecto a la activación mediada por receptor  $P2X_7$ , existen discrepancias sobre la dependencia de las respuestas a  $Ca^{2+}$ . Amstrup y Novak (2003) apoyan que la activación de las proteínas ERKs y la entrada de calcio son independientes y están reguladas por distintos dominios del receptor. Por el contrario, Gendron y cols. (2003) han propuesto, en los astrocitos de corteza, un mecanismo según el cual la activación de las ERKs depende del incremento de la concentración de calcio intracelular. Aunque este último grupo también ha detectado la participación de la  $PKC\delta$  independiente de calcio, que podría ser activada por el DAG generado por la fosfolipasa D (PLD) de manera similar a la que ellos mismos han descrito para el receptor  $P2Y_2$  (Neary y cols., 1999). Sin embargo, en los astrocitos de cerebelo de rata, la participación de la PLD puede ser descartada ya que las respuestas a BzATP y a UTP están mediadas por la PLC, ya que se bloquearon al pretratar las células con U-73122, al contrario de lo descrito por el grupo del Dr. Neary. Esta no es la única diferencia que existe entre la señalización purinérgica en los astrocitos de corteza y de cerebelo. Mientras que en

nuestro modelo no hemos detectado la presencia de receptores P2X, estos si se expresan en los astrocitos de corteza (Jimenez y cols., 2000; Fumagalli y cols., 2003; Washburn y Neary, 2006).

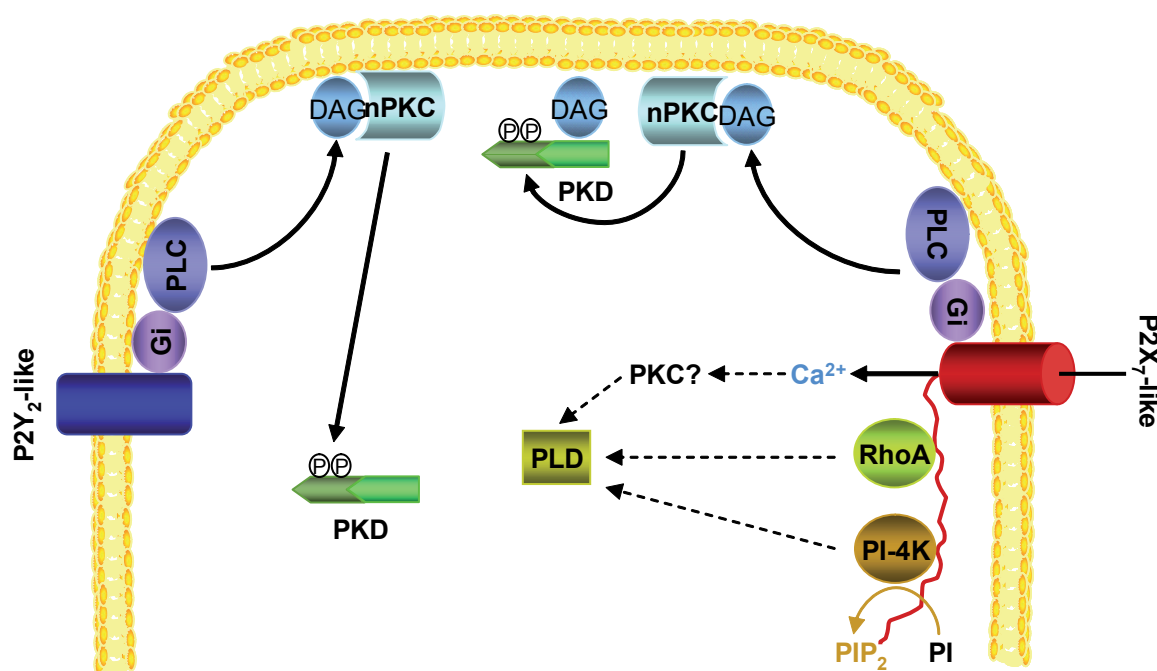


**Figura 83.- Esquema del mecanismo propuesto para la activación de las proteínas ERKs por los receptores P2Y<sub>2</sub> y P2X<sub>7</sub>-like.** Ambos receptores inducen la formación de DAG que activa nPKCs que pueden fosforilar diferentes proteínas de la cascada de las MAPKs. Es posible que, en el caso del receptor P2X<sub>7</sub>-like, también este implicado algún subtipo de cPKCs, cuya activación es inducida por la movilización de calcio de los reservorios intracelulares.

### **2.3.- El receptor P2X<sub>7</sub>-like activa a la PKD mediante cascadas de señalización ionotrópicas y metabotrópicas.**

Al contrario del gran paralelismo que existe en la activación de las proteínas ERKs por UTP y BzATP, si hemos encontrado diferencias entre la activación y distribución subcelular de la PKD inducida por ambos nucleótidos. La fosforilación causada por UTP está mediada por un mecanismo metabotrópico similar al descrito para otros receptores. Sin embargo, la fosforilación de PKD inducida por BzATP solo fue parcialmente bloqueada por la preincubación con el U73122. El porcentaje de respuesta que se mantiene cuando se lleva a cabo dicho tratamiento, coincide con el porcentaje de inhibición observado al quelar el calcio extracelular. Además, aunque no se ha mostrado en esta tesis doctoral, cuando se realizan ambos tratamientos a la vez, antes de estimular las células, la fosforilación de

PKD se bloquea casi por completo. Esto indica que la activación de la PKD por el receptor  $P2X_7$ -like depende tanto del componente metabotrópico como del componente ionotrópico de la respuesta a BzATP. Esta pequeña dependencia de la entrada de calcio también ha sido descrita por Bradford y Soltoff (2002) en las glándulas salivares, donde la preincubación con EGTA disminuye un 30% la fosforilación de la PKD inducida por BzATP. En la figura 84, se muestra un esquema de las posibles vías de activación de la PKD por ambos nucleótidos.



**Figura 84.- Esquema del mecanismo propuesto para la activación de la proteínas quinasa D por los receptores  $P2Y_2$  y  $P2X_7$ -like.** Ambos receptores inducen la formación de DAG por la PLC. Este segundo mensajero activa  $nPKCs$  que fosforilan a la PKD. Por otro lado, el receptor  $P2X_7$ -like puede incrementar los niveles de DAG debido a la activación de la PLD a través de diferentes mecanismos en los que pueden estar implicadas la entrada de calcio extracelular o la activación de diferentes proteínas con las que interacciona mediante su extremo C-terminal. Como consecuencia de dicha formación adicional de DAG, el BzATP induce una activación más prolongada de PKD y su translocación a la membrana plasmática.

La fosforilación de la PKD es insensible a *toxina pertussis*, indicando que el componente metabotrópico de la respuesta no está mediado por una proteína  $G_i$ . Yuan y cols. (2001) han demostrado que la activación de PKD1 por bombesina puede ocurrir a través de dos vías insensibles a dicha toxina. La primera de ellas estaría mediada por subunidades  $G\alpha_q$ , mientras que en la segunda estaría implicada la activación de la proteína Rho por subunidades  $G\alpha_{13}$ . Ambas rutas conducirían a la activación de PKCs que fosforilarían a la PKD en los residuos Ser744/Ser748. Los dos mecanismos se diferencian en que, mientras que la activación constitutiva de las subunidades  $G\alpha_q$  induce una activación constante de PKD,

en el caso de las subunidades  $G\alpha_{13}$  una activación prolongada provoca la desensibilización de la respuesta (Yuan y cols., 2000; Yuan y cols., 2001).

La PKD puede modular otras cascadas de señalización, entre las que se encuentra la ruta de las proteínas ERKs (Hausser y cols., 2001). No existe un inhibidor específico de la PKD, generalmente cuando se quiere bloquear la activación de esta proteína se emplean inhibidores de las nPKCs, responsables de la fosforilación de la PKD, como el Gö6850. En el caso de los astrocitos de cerebelo de rata, este compuesto bloquea la fosforilación tanto de PKD como de las ERKs. Por tanto, en principio se podría pensar que PKD está regulando a estas MAPKs. Sin embargo, la sensibilidad de las dos respuestas a *toxina pertussis* es diferente, lo que indica que cada una está mediada por un tipo de proteína G, y probablemente a través de diferentes mecanismos, aunque en ambos están implicadas nPKCs. Asimismo, la fosforilación de la PKD no se vio afectada por el pretratamiento del U-0126, inhibidor de MEK1/2, indicando que la respuesta no está regulada por las MAPKs.

Como se ha comentado, la activación de la PKD inducida por BzATP se bloquea totalmente al pretratar con el Gö6850, pero solo es parcialmente sensible al U-73122. Estos resultados indican que se requiere la activación de otra proteína que regule la producción de DAG de manera más tardía, tras la activación del canal. La candidata más idónea es la fosfolipasa D (PLD) (Jenkins y Frohman, 2005). Se ha descrito que el receptor  $P2X_7$  puede activar a la PLD en diferentes tipos celulares a través de mecanismos dependientes e independientes de calcio (el-Moatassim y Dubyak, 1993; Sun y cols., 1999). En la glándula submaxilar, la activación de la PLD es parcialmente dependiente de calcio, siendo necesaria la participación de otras moléculas de señalización (Perez-Andres y cols., 2002; Pochet y cols., 2003). Por otro lado, no hay que olvidar que el receptor  $P2X_7$  puede interaccionar con otras proteínas a través de su dominio C-terminal por ejemplo, con la PI4-quinasa que participa en la síntesis de fosfatidilinositol-bisfosfato ( $PIP_2$ ) que es un cofactor de la PLD (Kim y cols., 2001a; Garcia-Marcos y cols., 2006a). Además, a través de dicha región C-terminal este receptor puede unirse a proteínas con dominio de homología a Src 3 (SH3), como son los factores de intercambio de nucleótidos de guanina y proteínas con actividad GTPasa. Estas a su vez pueden activar a proteínas G de pequeño tamaño que están involucradas en la activación de la PLD por ejemplo, la proteína Rho (Denlinger y cols., 2001; Garcia-Marcos y cols., 2006a).

Cuando se compara la activación de la PKD con 100  $\mu$ M UTP o BzATP con la inducida por 300  $\mu$ M BzATP, se observa que en este último caso es mayor y más sostenida. Este puede ser el motivo por el cual la translocación únicamente tiene lugar al estimular las células con 300  $\mu$ M BzATP. Es posible que en este caso la respuesta sea más mantenida debido a una mayor producción tardía de DAG como consecuencia de una mayor actividad ionotrópica. No hay que olvidar que en las respuestas de calcio, la magnitud del componente metabotrópico transitorio a 100  $\mu$ M y 300  $\mu$ M BzATP eran iguales, mientras que el componente ionotrópico aumentaba con la concentración.

Los experimentos realizados con las células transfectadas con eGFP-PKD sugieren que esta proteína está implicada en las acciones tróficas del BzATP. Los cambios morfológicos inducidos por 300  $\mu$ M BzATP se aparecen a los 30 minutos de estimulación, coincidiendo con el inicio de la translocación de la proteína.

A diferencia de lo que ocurre con la proteína endógena, 100  $\mu$ M UTP no induce la fosforilación de los residuos Ser<sup>744</sup>/Ser<sup>748</sup>, y por tanto la activación, de la proteína eGFP-PKDwt. El residuo Ser<sup>916</sup> de la proteína exógena puede ser fosforilada por la proteína endógena, sin necesidad de que la proteína exógena sea activada (Sanchez-Ruiloba y cols., 2006). Es posible que el UTP, al no presentar señalización ionotrópica, no induzca la producción del DAG necesario para que tenga lugar dicha activación.

#### **2.4.- Posibles implicaciones fisiológicas de la activación de los receptores de nucleótidos en los astrocitos de cerebelo.**

Según los resultados presentados en esta Tesis, se podría pensar que la señalización intracelular de los receptores de nucleótidos en los astrocitos es bastante redundante. Sin embargo, hay que tener en cuenta que existen una serie de diferencias entre las cascadas activadas por los diferentes nucleótidos. Tanto el 2MeSADP, como el UTP y el BzATP inducen la activación de las ERKs, pero difieren en el mecanismo intracelular. Asimismo, sólo los dos últimos agonistas activan a la PKD aunque mediante distintas cascadas de señalización. Estas diferencias, junto con el hecho de que los receptores purinérgicos pueden localizarse en distintos dominios de la membrana y que, dependiendo de las condiciones, se liberan unos nucleótidos u otros pueden explicar los diferentes efectos fisiológicos de estos compuestos. Por ejemplo, las células del endotelio vascular coexpresan los receptor P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>2</sub>, ambos capaces de activar a las proteínas ERKs (Seye y cols., 2003; Shen y Dicorleto, 2008). En condiciones patológicas, como isquemia o estrés mecánico, estas células liberan UTP que, a través del receptor P2Y<sub>2</sub>, induce la proliferación y contracción de las células del músculo liso vascular (Shen y cols., 2006). Sin embargo, en condiciones fisiológicas, se ha comprobado que el ADP activa al receptor P2Y<sub>1</sub> e induce la liberación de NO y la relajación de la vasculatura (Kaiser y Buxton, 2002).

En el caso de los astrocitos de cerebelo de rata, la activación del receptor P2X<sub>7</sub> induce cambios en la morfología que no son mimetizados por ningún otro nucleótido, mientras que el receptor P2Y<sub>2</sub> está implicado en procesos de migración. Muchos autores han descrito la participación de los receptores P2 en quimiotaxis, entre los que se encuentran los receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> y P2Y<sub>12</sub> (Chaulet y cols., 2001; Honda y cols., 2001; Pillois y cols., 2002; Omatsu-Kanbe y cols., 2006). En concreto, el receptor P2Y<sub>2</sub> está implicado en la migración celular en músculo liso vascular, contribuyendo a la remodelación de la pared arterial que tiene lugar como respuesta a la dilatación mecánica o al daño de los vasos sanguíneos.

No se puede descartar la posibilidad de que los receptores purinérgicos expresados en los astrocitos de cerebelo de rata se regulen entre sí. Como se ha comentado a lo largo



de esta discusión, dicha interacción es bastante probable en el caso de los receptores P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>13</sub>-like. Asimismo, hay un dato que sugiere que existe un mecanismo de modulación entre el receptor P2Y<sub>2</sub> y P2X<sub>7</sub>. Cuando las células se estimulan con concentraciones del agonista fisiológico, el ATP, que debían activar al receptor P2X<sub>7</sub> no se observan las mismas respuestas que cuando se lleva a cabo la estimulación con BzATP. Por el contrario las respuestas a ATP son similares a las provocadas por el agonista del receptor P2Y<sub>2</sub> y parecen estar mediadas por el mismo receptor que las respuestas a UTP. Esta interacción podría ser similar a la observada entre los receptores P2Y<sub>1</sub> y P2X<sub>3</sub>, mediante la cual el primero inhibe al segundo, y que podría ser la causa del efecto analgésico del ADP (Gerevich y cols., 2005). La activación del receptor P2X<sub>7</sub> va acompañada, en muchas ocasiones, de procesos que se observan durante la astrogliosis y que desencadenan efectos no deseados, como consecuencia de una activación excesiva de los astrocitos. Recientemente, se ha descrito que en astrocitos el receptor P2Y<sub>2</sub> desempeña un importante papel neuroprotector (Chorna y cols., 2004). Por tanto, dicha interacción podría ser un mecanismo de control de la magnitud de la respuesta a daño celular al tiempo que supondría un mecanismo de neuroprotección en condiciones patológicas.

La interacción entre los diferentes receptores purinérgicos puede ser favorecida por su localización en las mismas regiones de la membrana. Como ya se ha comentado, algunos subtipos de receptores de nucleótidos pueden encontrarse en dominios de membrana ricos en lípidos de baja densidad, denominadas balsas lipídicas, así como en otras regiones. Por tanto, es posible que exista una separación espacial que permita la regulación de diferentes cascadas de señalización, como ocurre con la activación de las proteínas ERKs y p38 MAPK por el receptor P2Y<sub>2</sub> (Sugawara y cols., 2007). Al igual que el receptor P2Y<sub>13</sub>, el receptor P2X<sub>7</sub> también ha sido detectado en las balsas lipídicas. En glándulas submaxilares, este receptor activa a la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) de manera independiente a la actividad del canal. Ambas respuestas presentan diferente sensibilidad a la depleción del colesterol, mientras que la activación de la PLA<sub>2</sub> se bloquea por completo, la entrada de calcio no se modifica (García-Marcos y cols., 2006b). Estos autores proponen un modelo según el cual, en las glándulas submaxilares, existe una forma monomérica del receptor que activa a la PLA<sub>2</sub> y que estaría localizada en dominios de membrana ricos en lípidos de baja densidad. Además, también habría una forma multimérica responsable de la formación del canal fuera de dichas regiones de la membrana. Es posible que en los astrocitos de cerebelo, exista una situación similar, lo que permitiría la separación espacial de las señalizaciones metabotrópica e ionotrópica del receptor P2X<sub>7</sub>-like.

Por todo ello, y afortunadamente, los resultados de esta tesis no constituyen un punto y final. Por el contrario, existen todavía numerosas incógnitas sobre el papel de los nucleótidos en sistema nervioso, en concreto en los astrocitos. Por suerte, en las últimas décadas se han realizado numerosos avances tanto en sistema purinérgico como en células gliales, campos a los que durante mucho tiempo no se les prestó atención pero que actualmente despiertan gran interés.

# 6

## Conclusiones





1.- Los astrocitos de cerebelo coexpresan dos receptores de ADP que pueden ser activados simultáneamente por concentraciones nanomolares del agonista, los receptores P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>13</sub>-like. El receptor P2Y<sub>1</sub> activa a la fosfolipasa C e induce la movilización de calcio intracelular y el receptor P2Y<sub>13</sub>-like está acoplado a la inhibición de la adenilato ciclasa a través de una proteína G<sub>i/o</sub>.

2.- La estimulación del receptor P2Y<sub>13</sub>-like también induce la fosforilación de las proteínas ERKs mediante un mecanismo dependiente de proteínas G<sub>i/o</sub> y de proteínas Src. A altas concentraciones de agonista, este receptor activa la fosfolipasa C y la movilización de los reservorios intracelulares de calcio.

3.- Los astrocitos de cerebelo expresan mRNAs de las subunidades P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub> y P2X<sub>7</sub>. Pero sólo las proteínas de las subunidades P2X<sub>4</sub> y P2X<sub>7</sub>.

4.- El receptor P2X<sub>7</sub>-like en los astrocitos de cerebelo de rata posee unas características peculiares: Su activación no induce la formación del poro citolítico ni apoptosis, sino que provoca cambios en la morfología de las células y presenta una señalización no canónica.

5.- El receptor P2X<sub>7</sub>-like está acoplado a diferentes cascadas de señalización. A través de mecanismos metabotrópicos induce la activación de la fosfolipasa C y la movilización de calcio de los reservorios intracelulares, así como la fosforilación de las proteínas ERKs. La activación de la proteína quinasa D inducida por el receptor P2X<sub>7</sub>-like está mediada por mecanismos de señalización metabotrópicos e ionotrópicos. Esta proteína quinasa parece estar implicada en los cambios morfológicos inducidos por BzATP.

1.- Cerebellar astrocytes coexpress two ADP receptor subtypes which can be simultaneously activated at nanomolar concentrations of the nucleotide, P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>13</sub>-like receptors. P2Y<sub>1</sub> receptor induces PLC activation and intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization and P2Y<sub>13</sub>-like receptor is coupled to adenylate cyclase inhibition by G<sub>i/o</sub> proteins.

2.- P2Y<sub>13</sub>-like receptor also elicited ERKs activation by an intracellular mechanism that involves G<sub>i/o</sub> proteins, Src and calcium-independent PKCs. This receptor is also coupled to PLC at high agonist concentrations.

3.- Cerebellar astrocytes express mRNA for P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub> and P2X<sub>7</sub> subunits, but only P2X<sub>4</sub> and P2X<sub>7</sub> proteins.

4.- P2X<sub>7</sub>-like receptor expressed in cerebellar astrocytes exhibits two major peculiarities, first its activation does not lead to the formation of membrane pores and second it presents a no canonical signalling.

5.- P2X<sub>7</sub>-like receptor activates different intracellular signalling pathways. This receptor induces phospholipase C activation and intracellular calcium mobilization, ERKs phosphorylation as well. Protein kinase D activation induced by P2X<sub>7</sub>-like receptor is mediated by metabotropic and ionotropic intracellular mechanisms. This kinase could be implicated in morphological changes elicited by BzATP.



## **Bibliografía**

---



- Abbracchio, M. P., Boeynaems, J. M., Barnard, E. A., Boyer, J. L., Kennedy, C., Miras-Portugal, M. T., King, B. F., Gachet, C., Jacobson, K. A., Weisman, G. A. and Burnstock, G. (2003). "Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y<sub>14</sub> receptor) adds diversity to the P2Y receptor family." *Trends Pharmacol Sci* **24**(2): 52-5.
- Abbracchio, M. P. and Burnstock, G. (1998). "Purinergic signalling: pathophysiological roles." *Jpn J Pharmacol* **78**(2): 113-45.
- Abedi, H., Rozengurt, E. and Zachary, I. (1998). "Rapid activation of the novel serine/threonine protein kinase, protein kinase D by phorbol esters, angiotensin II and PDGF-BB in vascular smooth muscle cells." *FEBS Lett* **427**(2): 209-12.
- Abraham, E. H., Prat, A. G., Gerweck, L., Seneveratne, T., Arceci, R. J., Kramer, R., Guidotti, G. and Cantiello, H. F. (1993). "The multidrug resistance (mdr1) gene product functions as an ATP channel." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(1): 312-6.
- Acuna-Castillo, C., Coddou, C., Bull, P., Brito, J. and Huidobro-Toro, J. P. (2007). "Differential role of extracellular histidines in copper, zinc, magnesium and proton modulation of the P2X<sub>7</sub> purinergic receptor." *J Neurochem* **101**(1): 17-26.
- Acuna-Castillo, C., Morales, B. and Huidobro-Toro, J. P. (2000). "Zinc and copper modulate differentially the P2X<sub>4</sub> receptor." *J Neurochem* **74**(4): 1529-37.
- Adinolfi, E., Callegari, M. G., Ferrari, D., Bolognesi, C., Minelli, M., Wieckowski, M. R., Pinton, P., Rizzuto, R. and Di Virgilio, F. (2005). "Basal activation of the P2X<sub>7</sub> ATP receptor elevates mitochondrial calcium and potential, increases cellular ATP levels, and promotes serum-independent growth." *Mol Biol Cell* **16**(7): 3260-72.
- Adinolfi, E., Melchiorri, L., Falzoni, S., Chiozzi, P., Morelli, A., Tieghi, A., Cuneo, A., Castoldi, G., Di Virgilio, F. and Baricordi, O. R. (2002). "P2X<sub>7</sub> receptor expression in evolutive and indolent forms of chronic B lymphocytic leukemia." *Blood* **99**(2): 706-8.
- Aga, M., Watters, J. J., Pfeiffer, Z. A., Wiepz, G. J., Sommer, J. A. and Bertics, P. J. (2004). "Evidence for nucleotide receptor modulation of cross talk between MAP kinase and NF-kappa B signaling pathways in murine RAW 264.7 macrophages." *Am J Physiol Cell Physiol* **286**(4): C923-30.
- Aguado, T., Palazuelos, J., Monory, K., Stella, N., Cravatt, B., Lutz, B., Marsicano, G., Kokaia, Z., Guzman, M. and Galve-Roperh, I. (2006). "The endocannabinoid system promotes astroglial differentiation by acting on neural progenitor cells." *J Neurosci* **26**(5): 1551-61.
- Alekseeva, N., Kablinger, A. S., Pinkston, J., Gonzalez-Toledo, E. C. and Minagar, A. (2005). "Hereditary ataxia and behavior." *Adv Neurol* **96**: 275-83.
- Altman, J. (1972). "Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat." *J. Comp. Neurol* **145**: 353-398.
- Alvarez-Buylla, A. and Lim, D. A. (2004). "For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain." *Neuron* **41**(5): 683-6.
- Allen, G., McColl, R., Barnard, H., Ringe, W. K., Fleckenstein, J. and Cullum, C. M. (2005). "Magnetic resonance imaging of cerebellar-prefrontal and cerebellar-parietal functional connectivity." *Neuroimage* **28**(1): 39-48.
- Amstrup, J. and Novak, I. (2003). "P2X<sub>7</sub> receptor activates extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 independently of Ca<sup>2+</sup> influx." *Biochem J* **374**(Pt 1): 51-61.
- Anderson, C. M. and Nedergaard, M. (2006). "Emerging challenges of assigning P2X<sub>7</sub> receptor function and immunoreactivity in neurons." *Trends Neurosci* **29**(5): 257-62.

- Angulo, M. C., Kozlov, A. S., Charpak, S. and Audinat, E. (2004). "Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus." *J Neurosci* **24**(31): 6920-7.
- Anthony, T. E., Klein, C., Fishell, G. and Heintz, N. (2004). "Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system." *Neuron* **41**(6): 881-90.
- Araque, A., Martin, E. D., Perea, G., Arellano, J. I. and Buno, W. (2002). "Synaptically released acetylcholine evokes Ca<sup>2+</sup> elevations in astrocytes in hippocampal slices." *J Neurosci* **22**(7): 2443-50.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P. and Haydon, P. G. (1998). "Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons." *Eur J Neurosci* **10**(6): 2129-42.
- Araque, A., Sanzgiri, R. P., Parpura, V. and Haydon, P. G. (1999). "Astrocyte-induced modulation of synaptic transmission." *Can J Physiol Pharmacol* **77**(9): 699-706.
- Arcuino, G., Lin, J. H., Takano, T., Liu, C., Jiang, L., Gao, Q., Kang, J. and Nedergaard, M. (2002). "Intercellular calcium signaling mediated by point-source burst release of ATP." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(15): 9840-5.
- Arevalo, J. C., Yano, H., Teng, K. K. and Chao, M. V. (2004). "A unique pathway for sustained neurotrophin signaling through an ankyrin-rich membrane-spanning protein." *Embo J* **23**(12): 2358-68.
- Armano, S., Rossi, P., Taglietti, V. and D'Angelo, E. (2000). "Long-term potentiation of intrinsic excitability at the mossy fiber-granule cell synapse of rat cerebellum." *J Neurosci* **20**(14): 5208-16.
- Atkinson, L., Milligan, C. J., Buckley, N. J. and Deuchars, J. (2002). "An ATP-gated ion channel at the cell nucleus." *Nature* **420**(6911): 42.
- Bagowski, C. P., Stein-Gerlach, M., Choidas, A. and Ullrich, A. (1999). "Cell-type specific phosphorylation of threonines T654 and T669 by PKD defines the signal capacity of the EGF receptor." *Embo J* **18**(20): 5567-76.
- Bahima, L., Aleu, J., Elias, M., Martin-Satue, M., Muhaisen, A., Blasi, J., Marsal, J. and Solsona, C. (2006). "Endogenous hemichannels play a role in the release of ATP from *Xenopus* oocytes." *J Cell Physiol* **206**(1): 95-102.
- Balcar, V. J., Li, Y., Killinger, S. and Bennett, M. R. (1995). "Autoradiography of P2x ATP receptors in the rat brain." *Br J Pharmacol* **115**(2): 302-6.
- Baltensperger, K. and Porzig, H. (1997). "The P2U purinoceptor obligatorily engages the heterotrimeric G protein G16 to mobilize intracellular Ca<sup>2+</sup> in human erythroleukemia cells." *J Biol Chem* **272**(15): 10151-9.
- Barbe, M. T., Monyer, H. and Bruzzone, R. (2006). "Cell-cell communication beyond connexins: the pannexin channels." *Physiology (Bethesda)* **21**: 103-14.
- Bardoni, R., Goldstein, P. A., Lee, C. J., Gu, J. G. and MacDermott, A. B. (1997). "ATP P2X receptors mediate fast synaptic transmission in the dorsal horn of the rat spinal cord." *J Neurosci* **17**(14): 5297-304.
- Baricordi, O. R., Melchiorri, L., Adinolfi, E., Falzoni, S., Chiozzi, P., Buell, G. and Di Virgilio, F. (1999). "Increased proliferation rate of lymphoid cells transfected with the P2X(7) ATP receptor." *J Biol Chem* **274**(47): 33206-8.
- Barrera, N. P., Henderson, R. M., Murrell-Lagnado, R. D. and Edwardson, J. M. (2007). "The stoichiometry of P2X2/6 receptor heteromers depends on relative subunit expression levels." *Biophys J* **93**(2): 505-12.
- Barrera, N. P., Ormond, S. J., Henderson, R. M., Murrell-Lagnado, R. D. and Edwardson, J. M. (2005). "Atomic force microscopy imaging demonstrates that P2X2 receptors are trimers but that P2X6 receptor subunits do not oligomerize." *J Biol Chem* **280**(11):

- 10759-65.
- Baurand, A., Eckly, A., Bari, N., Leon, C., Hechler, B., Cazenave, J. P. and Gachet, C. (2000). "Desensitization of the platelet aggregation response to ADP: differential down-regulation of the P2Y1 and P2cyc receptors." *Thromb Haemost* **84**(3): 484-91.
- Baurand, A., Eckly, A., Hechler, B., Kauffenstein, G., Galzi, J. L., Cazenave, J. P., Leon, C. and Gachet, C. (2005). "Differential regulation and relocalization of the platelet P2Y receptors after activation: a way to avoid loss of hemostatic properties?" *Mol Pharmacol* **67**(3): 721-33.
- Bergles, D. E., Diamond, J. S. and Jahr, C. E. (1999). "Clearance of glutamate inside the synapse and beyond." *Curr Opin Neurobiol* **9**(3): 293-8.
- Berne, R. M. (1963). "Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow." *Am J Physiol* **204**: 317-22.
- Berti-Mattera, L. N., Wilkins, P. L., Madhun, Z. and Suchovsky, D. (1996). "P2-purigenic receptors regulate phospholipase C and adenylate cyclase activities in immortalized Schwann cells." *Biochem J* **314** ( Pt 2): 555-61.
- Bezzi, P., Gundersen, V., Galbete, J. L., Seifert, G., Steinhauser, C., Pilati, E. and Volterra, A. (2004). "Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate." *Nat Neurosci* **7**(6): 613-20.
- Bian, X., Ren, J., DeVries, M., Schnegelsberg, B., Cockayne, D. A., Ford, A. P. and Galligan, J. J. (2003). "Peristalsis is impaired in the small intestine of mice lacking the P2X3 subunit." *J Physiol* **551**(Pt 1): 309-22.
- Bianchi, B. R., Lynch, K. J., Touma, E., Niforatos, W., Burgard, E. C., Alexander, K. M., Park, H. S., Yu, H., Metzger, R., Kowaluk, E., Jarvis, M. F. and van Biesen, T. (1999). "Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes." *Eur J Pharmacol* **376**(1-2): 127-38.
- Blaukat, A., Barac, A., Cross, M. J., Offermanns, S. and Dikic, I. (2000). "G protein-coupled receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation through cooperation of Galpha(q) and Galpha(i) signals." *Mol Cell Biol* **20**(18): 6837-48.
- Blondel, O., Collin, C., McCarran, W. J., Zhu, S., Zamostiano, R., Gozes, I., Brenneman, D. E. and McKay, R. D. (2000). "A glia-derived signal regulating neuronal differentiation." *J Neurosci* **20**(21): 8012-20.
- Bo, X. and Burnstock, G. (1994). "Distribution of [3H]alpha,beta-methylene ATP binding sites in rat brain and spinal cord." *Neuroreport* **5**(13): 1601-4.
- Bo, X., Jiang, L. H., Wilson, H. L., Kim, M., Burnstock, G., Surprenant, A. and North, R. A. (2003). "Pharmacological and biophysical properties of the human P2X5 receptor." *Mol Pharmacol* **63**(6): 1407-16.
- Bobanovic, L. K., Royle, S. J. and Murrell-Lagnado, R. D. (2002). "P2X receptor trafficking in neurons is subunit specific." *J Neurosci* **22**(12): 4814-24.
- Bodin, P. and Burnstock, G. (2001). "Purinergetic signalling: ATP release." *Neurochem Res* **26**(8-9): 959-69.
- Bogdanov, Y. D., Dale, L., King, B. F., Whittock, N. and Burnstock, G. (1997). "Early expression of a novel nucleotide receptor in the neural plate of *Xenopus* embryos." *J Biol Chem* **272**(19): 12583-90.
- Bollag, W. B., Dodd, M. E. and Shapiro, B. A. (2004). "Protein kinase D and keratinocyte proliferation." *Drug News Perspect* **17**(2): 117-26.
- Bonvento, G., Sibson, N. and Pellerin, L. (2002). "Does glutamate image your thoughts?" *Trends Neurosci* **25**(7): 359-64.
- Boue-Grabot, E., Archambault, V. and Seguela, P. (2000). "A protein kinase C site highly conserved in P2X subunits controls the desensitization kinetics of P2X(2) ATP-gated



- channels." *J Biol Chem* **275**(14): 10190-5.
- Bouvier, M. (2001). "Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors." *Nat Rev Neurosci* **2**(4): 274-86.
- Bowden, E. T., Barth, M., Thomas, D., Glazer, R. I. and Mueller, S. C. (1999). "An invasion-related complex of cortactin, paxillin and PKCmu associates with invadopodia at sites of extracellular matrix degradation." *Oncogene* **18**(31): 4440-9.
- Bowler, J. W., Bailey, R. J., North, R. A. and Surprenant, A. (2003). "P2X4, P2Y1 and P2Y2 receptors on rat alveolar macrophages." *Br J Pharmacol* **140**(3): 567-75.
- Boyer, J. L., Adams, M., Ravi, R. G., Jacobson, K. A. and Harden, T. K. (2002). "2-Chloro N(6)-methyl-(N)-methanocarpa-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate is a selective high affinity P2Y(1) receptor antagonist." *Br J Pharmacol* **135**(8): 2004-10.
- Boyer, J. L., Lazarowski, E. R., Chen, X. H. and Harden, T. K. (1993). "Identification of a P2Y-purinergic receptor that inhibits adenylyl cyclase." *J Pharmacol Exp Ther* **267**(3): 1140-6.
- Boyer, J. L., Mohanram, A., Camaioni, E., Jacobson, K. A. and Harden, T. K. (1998). "Competitive and selective antagonism of P2Y1 receptors by N6-methyl 2'-deoxyadenosine 3',5'-bisphosphate." *Br J Pharmacol* **124**(1): 1-3.
- Boyer, J. L., Waldo, G. L. and Harden, T. K. (1997). "Molecular cloning and expression of an avian G protein-coupled P2Y receptor." *Mol Pharmacol* **52**(6): 928-34.
- Boyer, J. L., Zohn, I. E., Jacobson, K. A. and Harden, T. K. (1994). "Differential effects of P2-purinoreceptor antagonists on phospholipase C- and adenylyl cyclase-coupled P2Y-purinoreceptors." *Br J Pharmacol* **113**(2): 614-20.
- Bracale, A., Cesca, F., Neubrand, V. E., Newsome, T. P., Way, M. and Schiavo, G. (2007). "Kidins220/ARMS is transported by a kinesin-1-based mechanism likely to be involved in neuronal differentiation." *Mol Biol Cell* **18**(1): 142-52.
- Bradford, M. D. and Soltoff, S. P. (2002). "P2X7 receptors activate protein kinase D and p42/p44 mitogen-activated protein kinase (MAPK) downstream of protein kinase C." *Biochem J* **366**(Pt 3): 745-55.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-54.
- Braun, K., Rettinger, J., Ganso, M., Kassack, M., Hildebrandt, C., Ullmann, H., Nickel, P., Schmalzing, G. and Lambrecht, G. (2001). "NF449: a subnanomolar potency antagonist at recombinant rat P2X1 receptors." *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **364**(3): 285-90.
- Brough, D., Le Feuvre, R. A., Wheeler, R. D., Solovyova, N., Hilfiker, S., Rothwell, N. J. and Verkhatsky, A. (2003). "Ca<sup>2+</sup> stores and Ca<sup>2+</sup> entry differentially contribute to the release of IL-1 beta and IL-1 alpha from murine macrophages." *J Immunol* **170**(6): 3029-36.
- Brown, S. G., Townsend-Nicholson, A., Jacobson, K. A., Burnstock, G. and King, B. F. (2002). "Heteromultimeric P2X(1/2) receptors show a novel sensitivity to extracellular pH." *J Pharmacol Exp Ther* **300**(2): 673-80.
- Budagian, V., Bulanova, E., Brovko, L., Orinska, Z., Fayad, R., Paus, R. and Bulfone-Paus, S. (2003). "Signaling through P2X7 receptor in human T cells involves p56lck, MAP kinases, and transcription factors AP-1 and NF-kappa B." *J Biol Chem* **278**(3): 1549-60.
- Buettner, R., Papoutsoglou, G., Scemes, E., Spray, D. C. and Dermietzel, R. (2000). "Evidence for secretory pathway localization of a voltage-dependent anion channel isoform." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(7): 3201-6.

- Buisman, H. P., Steinberg, T. H., Fischbarg, J., Silverstein, S. C., Vogelzang, S. A., Ince, C., Ypey, D. L. and Leijh, P. C. (1988). "Extracellular ATP induces a large nonselective conductance in macrophage plasma membranes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(21): 7988-92.
- Bulanova, E., Budagian, V., Orinska, Z., Hein, M., Petersen, F., Thon, L., Adam, D. and Bulfone-Paus, S. (2005). "Extracellular ATP induces cytokine expression and apoptosis through P2X7 receptor in murine mast cells." *J Immunol* **174**(7): 3880-90.
- Burnstock, G. (1972). "Purinergetic nerves." *Pharmacol Rev* **24**(3): 509-81.
- Burnstock, G. (1976). "Do some nerve cells release more than one transmitter?" *Neuroscience* **1**(4): 239-48.
- Burnstock, G. (2007). "Physiology and pathophysiology of purinergetic neurotransmission." *Physiol Rev* **87**(2): 659-797.
- Burnstock, G., Campbell, G., Satchell, D. and Smythe, A. (1970). "Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut." *Br J Pharmacol* **40**(4): 668-88.
- Burnstock, G. and Kennedy, C. (1985). "Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor?" *Gen Pharmacol* **16**(5): 433-40.
- Burnstock, G. and Knight, G. E. (2004). "Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems." *Int Rev Cytol* **240**: 31-304.
- Bushong, E. A., Martone, M. E., Jones, Y. Z. and Ellisman, M. H. (2002). "Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains." *J Neurosci* **22**(1): 183-92.
- Cabrera-Poch, N., Sanchez-Ruiloba, L., Rodriguez-Martinez, M. and Iglesias, T. (2004). "Lipid raft disruption triggers protein kinase C and Src-dependent protein kinase D activation and Kidins220 phosphorylation in neuronal cells." *J Biol Chem* **279**(27): 28592-602.
- Calvert, J. A. and Evans, R. J. (2004). "Heterogeneity of P2X receptors in sympathetic neurons: contribution of neuronal P2X1 receptors revealed using knockout mice." *Mol Pharmacol* **65**(1): 139-48.
- Cattaneo, M., Zighetti, M. L., Lombardi, R., Martinez, C., Lecchi, A., Conley, P. B., Ware, J. and Ruggeri, Z. M. (2003). "Molecular bases of defective signal transduction in the platelet P2Y12 receptor of a patient with congenital bleeding." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(4): 1978-83.
- Celil, A. B. and Campbell, P. G. (2005). "BMP-2 and insulin-like growth factor-I mediate Osterix (Osx) expression in human mesenchymal stem cells via the MAPK and protein kinase D signaling pathways." *J Biol Chem* **280**(36): 31353-9.
- Clarke, C. E., Benham, C. D., Bridges, A., George, A. R. and Meadows, H. J. (2000). "Mutation of histidine 286 of the human P2X4 purinoceptor removes extracellular pH sensitivity." *J Physiol* **523 Pt 3**: 697-703.
- Clyne, J. D., LaPointe, L. D. and Hume, R. I. (2002). "The role of histidine residues in modulation of the rat P2X(2) purinoceptor by zinc and pH." *J Physiol* **539**(Pt 2): 347-59.
- Clyne, J. D., Wang, L. F. and Hume, R. I. (2002). "Mutational analysis of the conserved cysteines of the rat P2X2 purinoceptor." *J Neurosci* **22**(10): 3873-80.
- Cockayne, D. A., Hamilton, S. G., Zhu, Q. M., Dunn, P. M., Zhong, Y., Novakovic, S., Malmberg, A. B., Cain, G., Berson, A., Kassotakis, L., Hedley, L., Lachnit, W. G., Burnstock, G., McMahon, S. B. and Ford, A. P. (2000). "Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X3-deficient mice." *Nature* **407**(6807):

- 1011-5.
- Coco, S., Calegari, F., Pravettoni, E., Pozzi, D., Taverna, E., Rosa, P., Matteoli, M. and Verderio, C. (2003). "Storage and release of ATP from astrocytes in culture." *J Biol Chem* **278**(2): 1354-62.
- Coddou, C., Acuna-Castillo, C., Bull, P. and Huidobro-Toro, J. P. (2007). "Dissecting the Facilitator and Inhibitor Allosteric Metal Sites of the P2X4 Receptor Channel: CRITICAL ROLES OF CYS132 FOR ZINC POTENTIATION AND ASP138 FOR COPPER INHIBITION." *J Biol Chem* **282**(51): 36879-36886.
- Coddou, C., Lorca, R. A., Acuna-Castillo, C., Grauso, M., Rassendren, F. and Huidobro-Toro, J. P. (2005). "Heavy metals modulate the activity of the purinergic P2X4 receptor." *Toxicol Appl Pharmacol* **202**(2): 121-31.
- Coddou, C., Morales, B., Gonzalez, J., Grauso, M., Gordillo, F., Bull, P., Rassendren, F. and Huidobro-Toro, J. P. (2003). "Histidine 140 plays a key role in the inhibitory modulation of the P2X4 nucleotide receptor by copper but not zinc." *J Biol Chem* **278**(38): 36777-85.
- Collo, G., North, R. A., Kawashima, E., Merlo-Pich, E., Neidhart, S., Surprenant, A. and Buell, G. (1996). "Cloning OF P2X5 and P2X6 receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels." *J Neurosci* **16**(8): 2495-507.
- Communi, D., Gonzalez, N. S., Detheux, M., Brezillon, S., Lannoy, V., Parmentier, M. and Boeynaems, J. M. (2001). "Identification of a novel human ADP receptor coupled to G(i)." *J Biol Chem* **276**(44): 41479-85.
- Communi, D., Govaerts, C., Parmentier, M. and Boeynaems, J. M. (1997). "Cloning of a human purinergic P2Y receptor coupled to phospholipase C and adenylyl cyclase." *J Biol Chem* **272**(51): 31969-73.
- Communi, D., Janssens, R., Robaye, B., Zeelis, N. and Boeynaems, J. M. (2000). "Rapid up-regulation of P2Y messengers during granulocytic differentiation of HL-60 cells." *FEBS Lett* **475**(1): 39-42.
- Communi, D., Janssens, R., Suarez-Huerta, N., Robaye, B. and Boeynaems, J. M. (2000). "Advances in signalling by extracellular nucleotides. the role and transduction mechanisms of P2Y receptors." *Cell Signal* **12**(6): 351-60.
- Communi, D., Motte, S., Boeynaems, J. M. and Piroton, S. (1996). "Pharmacological characterization of the human P2Y4 receptor." *Eur J Pharmacol* **317**(2-3): 383-9.
- Communi, D., Piroton, S., Parmentier, M. and Boeynaems, J. M. (1995). "Cloning and functional expression of a human uridine nucleotide receptor." *J Biol Chem* **270**(52): 30849-52.
- Communi, D., Robaye, B. and Boeynaems, J. M. (1999). "Pharmacological characterization of the human P2Y11 receptor." *Br J Pharmacol* **128**(6): 1199-206.
- Communi, D., Suarez-Huerta, N., Dussossoy, D., Savi, P. and Boeynaems, J. M. (2001). "Cotranscription and intergenic splicing of human P2Y11 and SSF1 genes." *J Biol Chem* **276**(19): 16561-6.
- Conigrave, A. D., van der Weyden, L., Holt, L., Jiang, L., Wilson, P., Christopherson, R. I. and Morris, M. B. (2000). "Extracellular ATP-dependent suppression of proliferation and induction of differentiation of human HL-60 leukemia cells by distinct mechanisms." *Biochem Pharmacol* **60**(11): 1585-91.
- Cook, S. P., Rodland, K. D. and McCleskey, E. W. (1998). "A memory for extracellular Ca<sup>2+</sup> by speeding recovery of P2X receptors from desensitization." *J Neurosci* **18**(22): 9238-44.
- Cooper, D. M. and Rodbell, M. (1979). "ADP is a potent inhibitor of human platelet plasma

- membrane adenylate cyclase." *Nature* **282**(5738): 517-8.
- Coull, J. A., Beggs, S., Boudreau, D., Boivin, D., Tsuda, M., Inoue, K., Gravel, C., Salter, M. W. and De Koninck, Y. (2005). "BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain." *Nature* **438**(7070): 1017-21.
- Cressman, V. L., Lazarowski, E., Homolya, L., Boucher, R. C., Koller, B. H. and Grubb, B. R. (1999). "Effect of loss of P2Y(2) receptor gene expression on nucleotide regulation of murine epithelial Cl(-) transport." *J Biol Chem* **274**(37): 26461-8.
- Czajkowski, R., Lei, L., Sabala, P. and Baranska, J. (2002). "ADP-evoked phospholipase C stimulation and adenylyl cyclase inhibition in glioma C6 cells occur through two distinct nucleotide receptors, P2Y(1) and P2Y(12)." *FEBS Lett* **513**(2-3): 179-83.
- Chabre, O., Conklin, B. R., Brandon, S., Bourne, H. R. and Limbird, L. E. (1994). "Coupling of the alpha 2A-adrenergic receptor to multiple G-proteins. A simple approach for estimating receptor-G-protein coupling efficiency in a transient expression system." *J Biol Chem* **269**(8): 5730-4.
- Chakfe, Y., Seguin, R., Antel, J. P., Morissette, C., Malo, D., Henderson, D. and Seguela, P. (2002). "ADP and AMP induce interleukin-1beta release from microglial cells through activation of ATP-primed P2X7 receptor channels." *J Neurosci* **22**(8): 3061-9.
- Chambers, J. K., Macdonald, L. E., Sarau, H. M., Ames, R. S., Freeman, K., Foley, J. J., Zhu, Y., McLaughlin, M. M., Murdock, P., McMillan, L., Trill, J., Swift, A., Aiyar, N., Taylor, P., Vawter, L., Naheed, S., Szekeres, P., Hervieu, G., Scott, C., Watson, J. M., Murphy, A. J., Duzic, E., Klein, C., Bergsma, D. J., Wilson, S. and Livi, G. P. (2000). "A G protein-coupled receptor for UDP-glucose." *J Biol Chem* **275**(15): 10767-71.
- Chan, W. Y., Kohsaka, S. and Rezaie, P. (2007). "The origin and cell lineage of microglia: new concepts." *Brain Res Rev* **53**(2): 344-54.
- Chang, M. S., Arevalo, J. C. and Chao, M. V. (2004). "Ternary complex with Trk, p75, and an ankyrin-rich membrane spanning protein." *J Neurosci Res* **78**(2): 186-92.
- Charles, A. C., Naus, C. C., Zhu, D., Kidder, G. M., Dirksen, E. R. and Sanderson, M. J. (1992). "Intercellular calcium signaling via gap junctions in glioma cells." *J Cell Biol* **118**(1): 195-201.
- Charlton, S. J., Brown, C. A., Weisman, G. A., Turner, J. T., Erb, L. and Boarder, M. R. (1996). "Cloned and transfected P2Y4 receptors: characterization of a suramin and PPADS-insensitive response to UTP." *Br J Pharmacol* **119**(7): 1301-3.
- Charlton, S. J., Brown, C. A., Weisman, G. A., Turner, J. T., Erb, L. and Boarder, M. R. (1996). "PPADS and suramin as antagonists at cloned P2Y- and P2U-purinoceptors." *Br J Pharmacol* **118**(3): 704-10.
- Chaulet, H., Desgranges, C., Renault, M. A., Dupuch, F., Ezan, G., Peiretti, F., Loirand, G., Pacaud, P. and Gadeau, A. P. (2001). "Extracellular nucleotides induce arterial smooth muscle cell migration via osteopontin." *Circ Res* **89**(9): 772-8.
- Chaumont, S., Jiang, L. H., Penna, A., North, R. A. and Rassendren, F. (2004). "Identification of a trafficking motif involved in the stabilization and polarization of P2X receptors." *J Biol Chem* **279**(28): 29628-38.
- Chen, C. C., Akopian, A. N., Sivilotti, L., Colquhoun, D., Burnstock, G. and Wood, J. N. (1995). "A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons." *Nature* **377**(6548): 428-31.
- Chessell, I. P., Michel, A. D. and Humphrey, P. P. (1998). "Effects of antagonists at the human recombinant P2X7 receptor." *Br J Pharmacol* **124**(6): 1314-20.
- Choi, R. C., Simon, J., Tsim, K. W. and Barnard, E. A. (2008). "Constitutive and agonist-induced dimerizations of the P2Y1 receptor: Relationship to internalization and scaffolding." *J Biol Chem*.



- Chorna, N. E., Santiago-Perez, L. I., Erb, L., Seye, C. I., Neary, J. T., Sun, G. Y., Weisman, G. A. and Gonzalez, F. A. (2004). "P2Y receptors activate neuroprotective mechanisms in astrocytic cells." *J Neurochem* **91**(1): 119-32.
- Christopherson, K. S., Ullian, E. M., Stokes, C. C., Mallowney, C. E., Hell, J. W., Agah, A., Lawler, J., Mosher, D. F., Bornstein, P. and Barres, B. A. (2005). "Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis." *Cell* **120**(3): 421-33.
- D'Ambrosi, N., Iafrate, M., Saba, E., Rosa, P. and Volonte, C. (2007). "Comparative analysis of P2Y<sub>4</sub> and P2Y<sub>6</sub> receptor architecture in native and transfected neuronal systems." *Biochim Biophys Acta* **1768**(6): 1592-9.
- D'Ambrosi, N., Iafrate, M., Vacca, F., Amadio, S., Tozzi, A., Mercuri, N. and Volonte, C. (2006). "The P2Y<sub>4</sub> receptor forms homo-oligomeric complexes in several CNS and PNS neural cells." *Purinergic Signalling* **2**: 575-582.
- Dahl, G. and Locovei, S. (2006). "Pannexin: to gap or not to gap, is that a question?" *IUBMB Life* **58**(7): 409-19.
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J. V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D. R., Dustin, M. L. and Gan, W. B. (2005). "ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo." *Nat Neurosci* **8**(6): 752-8.
- Defer, N., Best-Belpomme, M. and Hanoune, J. (2000). "Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase." *Am J Physiol Renal Physiol* **279**(3): F400-16.
- Delicado, E. G., Jimenez, A. I., Carrasquero, L. M., Castro, E. and Miras-Portugal, M. T. (2005). "Cross-talk among epidermal growth factor, Ap(5)A, and nucleotide receptors causing enhanced ATP Ca(2+) signaling involves extracellular kinase activation in cerebellar astrocytes." *J Neurosci Res* **81**(6): 789-96.
- Denlinger, L. C., Angelini, G., Schell, K., Green, D. N., Guadarrama, A. G., Prabhu, U., Coursin, D. B., Bertics, P. J. and Hogan, K. (2005). "Detection of human P2X<sub>7</sub> nucleotide receptor polymorphisms by a novel monocyte pore assay predictive of alterations in lipopolysaccharide-induced cytokine production." *J Immunol* **174**(7): 4424-31.
- Denlinger, L. C., Fisette, P. L., Sommer, J. A., Watters, J. J., Prabhu, U., Dubyak, G. R., Proctor, R. A. and Bertics, P. J. (2001). "Cutting edge: the nucleotide receptor P2X<sub>7</sub> contains multiple protein- and lipid-interaction motifs including a potential binding site for bacterial lipopolysaccharide." *J Immunol* **167**(4): 1871-6.
- Deuchars, S. A., Atkinson, L., Brooke, R. E., Musa, H., Milligan, C. J., Batten, T. F., Buckley, N. J., Parson, S. H. and Deuchars, J. (2001). "Neuronal P2X<sub>7</sub> receptors are targeted to presynaptic terminals in the central and peripheral nervous systems." *J Neurosci* **21**(18): 7143-52.
- Deuticke, H. J. (1932). "Über den einfluss von adenosin und adenosinphosphorsäuren auf den isolierten Meerschweinuterus." *Pflüg Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere* **230**: 537-555.
- Devi, L. A. (2001). "Heterodimerization of G-protein-coupled receptors: pharmacology, signaling and trafficking." *Trends Pharmacol Sci* **22**(10): 532-7.
- Dhulipala, P. D., Wang, Y. X. and Kotlikoff, M. I. (1998). "The human P2X<sub>4</sub> receptor gene is alternatively spliced." *Gene* **207**(2): 259-66.
- Di Virgilio, F. (1995). "The P2Z purinoceptor: an intriguing role in immunity, inflammation and cell death." *Immunol Today* **16**(11): 524-8.
- Diaz-Hernandez, M., Gomez-Villafuertes, R., Hernando, F., Pintor, J. and Miras-Portugal, M. T. (2001). "Presence of different ATP receptors on rat midbrain single synaptic

- terminals. Involvement of the P2X(3) subunits." *Neurosci Lett* **301**(3): 159-62.
- Diaz-Hernandez, M., Pintor, J., Castro, E. and Miras-Portugal, M. T. (2002). "Co-localisation of functional nicotinic and ionotropic nucleotide receptors in isolated cholinergic synaptic terminals." *Neuropharmacology* **42**(1): 20-33.
- Diaz Anel, A. M. and Malhotra, V. (2005). "PKC $\epsilon$  is required for beta1gamma2/beta3gamma2- and PKD-mediated transport to the cell surface and the organization of the Golgi apparatus." *J Cell Biol* **169**(1): 83-91.
- Ding, S. and Sachs, F. (1999). "Single channel properties of P2X2 purinoceptors." *J Gen Physiol* **113**(5): 695-720.
- Ding, Z., Kim, S., Dorsam, R. T., Jin, J. and Kunapuli, S. P. (2003). "Inactivation of the human P2Y12 receptor by thiol reagents requires interaction with both extracellular cysteine residues, Cys17 and Cys270." *Blood* **101**(10): 3908-14.
- Domercq, M., Brambilla, L., Pilati, E., Marchaland, J., Volterra, A. and Bezzi, P. (2006). "P2Y1 receptor-evoked glutamate exocytosis from astrocytes: control by tumor necrosis factor-alpha and prostaglandins." *J Biol Chem* **281**(41): 30684-96.
- Doppler, H. and Storz, P. (2007). "A novel tyrosine phosphorylation site in protein kinase D contributes to oxidative stress-mediated activation." *J Biol Chem* **282**(44): 31873-81.
- Dorn, G., Patel, S., Wotherspoon, G., Hemmings-Mieszczak, M., Barclay, J., Natt, F. J., Martin, P., Bevan, S., Fox, A., Ganju, P., Wishart, W. and Hall, J. (2004). "siRNA relieves chronic neuropathic pain." *Nucleic Acids Res* **32**(5): e49.
- Dowdall, M. J., Boyne, A. F. and Whittaker, V. P. (1974). "Adenosine triphosphate. A constituent of cholinergic synaptic vesicles." *Biochem J* **140**(1): 1-12.
- Drury, A. N. and Szent-Gyorgyi, A. (1929). "The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart." *J Physiol* **68**(3): 213-37.
- Duan, S., Anderson, C. M., Keung, E. C., Chen, Y., Chen, Y. and Swanson, R. A. (2003). "P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes." *J Neurosci* **23**(4): 1320-8.
- Dubyak, G. R. and el-Moatassim, C. (1993). "Signal transduction via P2-purinergeric receptors for extracellular ATP and other nucleotides." *Am J Physiol* **265**(3 Pt 1): C577-606.
- Dunn, P. M. and Blakeley, A. G. (1988). "Suramin: a reversible P2-purinoceptor antagonist in the mouse vas deferens." *Br J Pharmacol* **93**(2): 243-5.
- Dunn, P. M., Liu, M., Zhong, Y., King, B. F. and Burnstock, G. (2000). "Diinosine pentaphosphate: an antagonist which discriminates between recombinant P2X(3) and P2X(2/3) receptors and between two P2X receptors in rat sensory neurones." *Br J Pharmacol* **130**(6): 1378-84.
- Dutton, G. R., Currie, D. N. and Tear, K. (1981). "An improved method for the bulk isolation of viable perikarya from postnatal cerebellum." *J Neurosci Methods* **3**(4): 421-7.
- Eason, M. G., Kurose, H., Holt, B. D., Raymond, J. R. and Liggett, S. B. (1992). "Simultaneous coupling of alpha 2-adrenergic receptors to two G-proteins with opposing effects. Subtype-selective coupling of alpha 2C10, alpha 2C4, and alpha 2C2 adrenergic receptors to Gi and Gs." *J Biol Chem* **267**(22): 15795-801.
- Edwards, F. A. and Gibb, A. J. (1993). "ATP--a fast neurotransmitter." *FEBS Lett* **325**(1-2): 86-9.
- Edwards, F. A., Gibb, A. J. and Colquhoun, D. (1992). "ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system." *Nature* **359**(6391): 144-7.
- Egan, T. M. and Khakh, B. S. (2004). "Contribution of calcium ions to P2X channel responses." *J Neurosci* **24**(13): 3413-20.

- Egan, T. M., Samways, D. S. and Li, Z. (2006). "Biophysics of P2X receptors." *Pflügers Arch* **452**(5): 501-12.
- el-Moatassim, C. and Dubyak, G. R. (1993). "Dissociation of the pore-forming and phospholipase D activities stimulated via P2z purinergic receptors in BAC1.2F5 macrophages. Product inhibition of phospholipase D enzyme activity." *J Biol Chem* **268**(21): 15571-8.
- Elssner, A., Duncan, M., Gavrilin, M. and Wewers, M. D. (2004). "A novel P2X7 receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide LL37, induces IL-1 beta processing and release." *J Immunol* **172**(8): 4987-94.
- Eltzschig, H. K., Eckle, T., Mager, A., Kuper, N., Karcher, C., Weissmuller, T., Boengler, K., Schulz, R., Robson, S. C. and Colgan, S. P. (2006). "ATP release from activated neutrophils occurs via connexin 43 and modulates adenosine-dependent endothelial cell function." *Circ Res* **99**(10): 1100-8.
- Endo, K., Oki, E., Biedermann, V., Kojima, H., Yoshida, K., Johannes, F. J., Kufe, D. and Datta, R. (2000). "Proteolytic cleavage and activation of protein kinase C [micro] by caspase-3 in the apoptotic response of cells to 1-beta -D-arabinofuranosylcytosine and other genotoxic agents." *J Biol Chem* **275**(24): 18476-81.
- Ennion, S., Hagan, S. and Evans, R. J. (2000). "The role of positively charged amino acids in ATP recognition by human P2X(1) receptors." *J Biol Chem* **275**(38): 29361-7.
- Ennion, S. J. and Evans, R. J. (2001). "Agonist-stimulated internalisation of the ligand-gated ion channel P2X(1) in rat vas deferens." *FEBS Lett* **489**(2-3): 154-8.
- Ennion, S. J. and Evans, R. J. (2002). "Conserved cysteine residues in the extracellular loop of the human P2X(1) receptor form disulfide bonds and are involved in receptor trafficking to the cell surface." *Mol Pharmacol* **61**(2): 303-11.
- Ennion, S. J., Ritson, J. and Evans, R. J. (2001). "Conserved negatively charged residues are not required for ATP action at P2X(1) receptors." *Biochem Biophys Res Commun* **289**(3): 700-4.
- Erb, L., Garrad, R., Wang, Y., Quinn, T., Turner, J. T. and Weisman, G. A. (1995). "Site-directed mutagenesis of P2U purinoceptors. Positively charged amino acids in transmembrane helices 6 and 7 affect agonist potency and specificity." *J Biol Chem* **270**(9): 4185-8.
- Evans, R. J., Derkach, V. and Surprenant, A. (1992). "ATP mediates fast synaptic transmission in mammalian neurons." *Nature* **357**(6378): 503-5.
- Exner, C., Weniger, G. and Irle, E. (2004). "Cerebellar lesions in the PICA but not SCA territory impair cognition." *Neurology* **63**(11): 2132-5.
- Fabre, J. E., Nguyen, M., Latour, A., Keifer, J. A., Audoly, L. P., Coffman, T. M. and Koller, B. H. (1999). "Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y1-deficient mice." *Nat Med* **5**(10): 1199-202.
- Faria, R. X., Defarias, F. P. and Alves, L. A. (2005). "Are second messengers crucial for opening the pore associated with P2X7 receptor?" *Am J Physiol Cell Physiol* **288**(2): C260-71.
- Fellin, T., Pascual, O., Gobbo, S., Pozzan, T., Haydon, P. G. and Carmignoto, G. (2004). "Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors." *Neuron* **43**(5): 729-43.
- Fellin, T., Pozzan, T. and Carmignoto, G. (2006). "Purinergic receptors mediate two distinct glutamate release pathways in hippocampal astrocytes." *J Biol Chem* **281**(7): 4274-84.
- Filippov, A. K., Simon, J., Barnard, E. A. and Brown, D. A. (2003). "Coupling of the nucleotide P2Y4 receptor to neuronal ion channels." *Br J Pharmacol* **138**(2): 400-6.

- Finger, T. E., Danilova, V., Barrows, J., Bartel, D. L., Vigers, A. J., Stone, L., Hellekant, G. and Kinnamon, S. C. (2005). "ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves." *Science* **310**(5753): 1495-9.
- Flores, R. V., Hernandez-Perez, M. G., Aquino, E., Garrad, R. C., Weisman, G. A. and Gonzalez, F. A. (2005). "Agonist-induced phosphorylation and desensitization of the P2Y2 nucleotide receptor." *Mol Cell Biochem* **280**(1-2): 35-45.
- Freeman, K., Tsui, P., Moore, D., Emson, P. C., Vawter, L., Naheed, S., Lane, P., Bawagan, H., Herrity, N., Murphy, K., Sarau, H. M., Ames, R. S., Wilson, S., Livi, G. P. and Chambers, J. K. (2001). "Cloning, pharmacology, and tissue distribution of G-protein-coupled receptor GPR105 (KIAA0001) rodent orthologs." *Genomics* **78**(3): 124-8.
- Fumagalli, M., Brambilla, R., D'Ambrosi, N., Volonte, C., Matteoli, M., Verderio, C. and Abbracchio, M. P. (2003). "Nucleotide-mediated calcium signaling in rat cortical astrocytes: Role of P2X and P2Y receptors." *Glia* **43**(3): 218-03.
- Fumagalli, M., Trincavelli, L., Lecca, D., Martini, C., Ciana, P. and Abbracchio, M. P. (2004). "Cloning, pharmacological characterisation and distribution of the rat G-protein-coupled P2Y(13) receptor." *Biochem Pharmacol* **68**(1): 113-24.
- Gachet, C. (2005). "The platelet P2 receptors as molecular targets for old and new antiplatelet drugs." *Pharmacol Ther* **108**(2): 180-92.
- Garcia-Guzman, M., Soto, F., Laube, B. and Stuhmer, W. (1996). "Molecular cloning and functional expression of a novel rat heart P2X purinoceptor." *FEBS Lett* **388**(2-3): 123-7.
- Garcia-Lecea, M., Delicado, E. G., Miras-Portugal, M. T. and Castro, E. (1999). "P2X2 characteristics of the ATP receptor coupled to  $[Ca^{2+}]_i$  increases in cultured Purkinje neurons from neonatal rat cerebellum." *Neuropharmacology* **38**(5): 699-706.
- Garcia-Lecea, M., Sen, R. P., Soto, F., Miras-Portugal, M. T. and Castro, E. (2001). "P2 receptors in cerebellar neurons: molecular diversity of ionotropic ATP receptors in Purkinje cells." *Drug Dev Res* **52**: 104-113.
- Garcia-Marcos, M., Perez-Andres, E., Tandel, S., Fontanils, U., Kumps, A., Kabre, E., Gomez-Munoz, A., Marino, A., Dehaye, J. P. and Pochet, S. (2006). "Coupling of two pools of P2X7 receptors to distinct intracellular signaling pathways in rat submandibular gland." *J Lipid Res* **47**(4): 705-14.
- Garcia-Marcos, M., Pochet, S., Marino, A. and Dehaye, J. P. (2006). "P2X7 and phospholipid signalling: the search of the "missing link" in epithelial cells." *Cell Signal* **18**(12): 2098-104.
- Garrad, R. C., Otero, M. A., Erb, L., Theiss, P. M., Clarke, L. L., Gonzalez, F. A., Turner, J. T. and Weisman, G. A. (1998). "Structural basis of agonist-induced desensitization and sequestration of the P2Y2 nucleotide receptor. Consequences of truncation of the C terminus." *J Biol Chem* **273**(45): 29437-44.
- Gartland, A., Hipskind, R. A., Gallagher, J. A. and Bowler, W. B. (2001). "Expression of a P2X7 receptor by a subpopulation of human osteoblasts." *J Bone Miner Res* **16**(5): 846-56.
- Gendron, F. P., Chalimoniuk, M., Strosznajder, J., Shen, S., Gonzalez, F. A., Weisman, G. A. and Sun, G. Y. (2003). "P2X7 nucleotide receptor activation enhances IFN gamma-induced type II nitric oxide synthase activity in BV-2 microglial cells." *J Neurochem* **87**(2): 344-52.
- Gendron, F. P., Neary, J. T., Theiss, P. M., Sun, G. Y., Gonzalez, F. A. and Weisman, G. A. (2003). "Mechanisms of P2X7 receptor-mediated ERK1/2 phosphorylation in human astrocytoma cells." *Am J Physiol Cell Physiol* **284**(2): C571-81.
- Gerevich, Z., Muller, C. and Illes, P. (2005). "Metabotropic P2Y1 receptors inhibit P2X3



- receptor-channels in rat dorsal root ganglion neurons." *Eur J Pharmacol* **521**(1-3): 34-8.
- Ghanekar, Y. and Lowe, M. (2005). "Protein kinase D: activation for Golgi carrier formation." *Trends Cell Biol* **15**(10): 511-4.
- Giaroni, C., Knight, G. E., Zanetti, E., Chiaravalli, A. M., Lecchini, S., Frigo, G. and Burnstock, G. (2006). "Postnatal development of P2 receptors in the murine gastrointestinal tract." *Neuropharmacology* **50**(6): 690-704.
- Gillespie, J. H. (1934). "The biological significance of the linkages in adenosine triphosphoric acid." *J Physiol* **80**(4): 345-59.
- Giovannelli, A., Grassi, F., Mattei, E., Mileo, A. M. and Eusebi, F. (1991). "Acetylcholine induces voltage-independent increase of cytosolic calcium in mouse myotubes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(22): 10069-73.
- Goldsmith, Z. G. and Dhanasekaran, D. N. (2007). "G protein regulation of MAPK networks." *Oncogene* **26**(22): 3122-42.
- Gomez-Villafuertes, R., Gualix, J. and Miras-Portugal, M. T. (2001). "Single GABAergic synaptic terminals from rat midbrain exhibit functional P2X and dinucleotide receptors, able to induce GABA secretion." *J Neurochem* **77**(1): 84-93.
- Gordon, J. L. (1986). "Extracellular ATP: effects, sources and fate." *Biochem J* **233**(2): 309-19.
- Goritz, C., Mauch, D. H. and Pfrieger, F. W. (2005). "Multiple mechanisms mediate cholesterol-induced synaptogenesis in a CNS neuron." *Mol Cell Neurosci* **29**(2): 190-201.
- Gourine, A. V. (2005). "On the peripheral and central chemoreception and control of breathing: an emerging role of ATP." *J Physiol* **568**(Pt 3): 715-24.
- Gourine, A. V., Dale, N., Llaudet, E., Poputnikov, D. M., Spyer, K. M. and Gourine, V. N. (2007). "Release of ATP in the central nervous system during systemic inflammation: real-time measurement in the hypothalamus of conscious rabbits." *J Physiol* **585**(Pt 1): 305-16.
- Gozes, I. and Brenneman, D. E. (2000). "A new concept in the pharmacology of neuroprotection." *J Mol Neurosci* **14**(1-2): 61-8.
- Grill, J., Viguier, D., Kieffer, V., Bulteau, C., Sainte-Rose, C., Hartmann, O., Kalifa, C. and Dellatolas, G. (2004). "Critical risk factors for intellectual impairment in children with posterior fossa tumors: the role of cerebellar damage." *J Neurosurg* **101**(2 Suppl): 152-8.
- Grobben, B., Claes, P., Van Kolen, K., Roymans, D., Fransen, P., Sys, S. U. and Slegers, H. (2001). "Agonists of the P2Y(AC)-receptor activate MAP kinase by a ras-independent pathway in rat C6 glioma." *J Neurochem* **78**(6): 1325-38.
- Grosche, J., Matyash, V., Moller, T., Verkhratsky, A., Reichenbach, A. and Kettenmann, H. (1999). "Microdomains for neuron-glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann glial cells." *Nat Neurosci* **2**(2): 139-43.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R. Y. (1985). "A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties." *J Biol Chem* **260**(6): 3440-50.
- Gu, B. J., Sluyter, R., Skarratt, K. K., Shemon, A. N., Dao-Ung, L. P., Fuller, S. J., Barden, J. A., Clarke, A. L., Petrou, S. and Wiley, J. S. (2004). "An Arg307 to Gln polymorphism within the ATP-binding site causes loss of function of the human P2X7 receptor." *J Biol Chem* **279**(30): 31287-95.
- Gualix, J., Fideu, M. D., Pintor, J., Rotllan, P., Garcia-Carmona, F. and Miras-Portugal, M. T. (1997). "Characterization of diadenosine polyphosphate transport into chromaffin granules from adrenal medulla." *Faseb J* **11**(12): 981-90.

- Gualix, J., Gomez-Villafuertes, R., Diaz-Hernandez, M. and Miras-Portugal, M. T. (2003). "Presence of functional ATP and dinucleotide receptors in glutamatergic synaptic terminals from rat midbrain." *J Neurochem* **87**(1): 160-71.
- Gualix, J., Pintor, J. and Miras-Portugal, M. T. (1999). "Characterization of nucleotide transport into rat brain synaptic vesicles." *J Neurochem* **73**(3): 1098-104.
- Guo, C., Masin, M., Qureshi, O. S. and Murrell-Lagnado, R. D. (2007). "Evidence for functional P2X<sub>4</sub>/P2X<sub>7</sub> heteromeric receptors." *Mol Pharmacol* **72**(6): 1447-56.
- Guo, D., Von Kugelgen, I., Moro, S., Kim, H. S. and Jacobson, K. A. (2002). "Evidence for recognition of non-nucleotide antagonist within the transmembrane domains of the human P2Y<sub>1</sub> receptor." *Drug Dev Res* **57**: 173-181.
- Haines, W. R., Migita, K., Cox, J. A., Egan, T. M. and Voigt, M. M. (2001). "The first transmembrane domain of the P2X receptor subunit participates in the agonist-induced gating of the channel." *J Biol Chem* **276**(35): 32793-8.
- Haines, W. R., Torres, G. E., Voigt, M. M. and Egan, T. M. (1999). "Properties of the novel ATP-gated ionotropic receptor composed of the P2X(1) and P2X(5) isoforms." *Mol Pharmacol* **56**(4): 720-7.
- Hall, R. A., Ostedgaard, L. S., Premont, R. T., Blitzer, J. T., Rahman, N., Welsh, M. J. and Lefkowitz, R. J. (1998). "A C-terminal motif found in the beta2-adrenergic receptor, P2Y<sub>1</sub> receptor and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator determines binding to the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor family of PDZ proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(15): 8496-501.
- Hama, H., Hara, C., Yamaguchi, K. and Miyawaki, A. (2004). "PKC signaling mediates global enhancement of excitatory synaptogenesis in neurons triggered by local contact with astrocytes." *Neuron* **41**(3): 405-15.
- Hansel, C., Linden, D. J. and D'Angelo, E. (2001). "Beyond parallel fiber LTD: the diversity of synaptic and non-synaptic plasticity in the cerebellum." *Nat Neurosci* **4**(5): 467-75.
- Hansen, M. A., Bennett, M. R. and Barden, J. A. (1999). "Distribution of purinergic P2X receptors in the rat heart." *J Auton Nerv Syst* **78**(1): 1-9.
- Hardy, A. R., Conley, P. B., Luo, J., Benovic, J. L., Poole, A. W. and Mundell, S. J. (2005). "P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>12</sub> receptors for ADP desensitize by distinct kinase-dependent mechanisms." *Blood* **105**(9): 3552-60.
- Hardy, A. R., Jones, M. L., Mundell, S. J. and Poole, A. W. (2004). "Reciprocal cross-talk between P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>12</sub> receptors at the level of calcium signaling in human platelets." *Blood* **104**(6): 1745-52.
- Hardy, L. A., Harvey, I. J., Chambers, P. and Gillespie, J. I. (2000). "A putative alternatively spliced variant of the P2X(1) purinoreceptor in human bladder." *Exp Physiol* **85**(4): 461-3.
- Hassinger, T. D., Atkinson, P. B., Strecker, G. J., Whalen, L. R., Dudek, F. E., Kossel, A. H. and Kater, S. B. (1995). "Evidence for glutamate-mediated activation of hippocampal neurons by glial calcium waves." *J Neurobiol* **28**(2): 159-70.
- Hassinger, T. D., Guthrie, P. B., Atkinson, P. B., Bennett, M. V. and Kater, S. B. (1996). "An extracellular signaling component in propagation of astrocytic calcium waves." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(23): 13268-73.
- Hausser, A., Storz, P., Hubner, S., Braendlin, I., Martinez-Moya, M., Link, G. and Johannes, F. J. (2001). "Protein kinase C mu selectively activates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) p42 pathway." *FEBS Lett* **492**(1-2): 39-44.
- Hausser, A., Storz, P., Link, G., Stoll, H., Liu, Y. C., Altman, A., Pfizenmaier, K. and Johannes, F. J. (1999). "Protein kinase C mu is negatively regulated by 14-3-3 signal

- transduction proteins." *J Biol Chem* **274**(14): 9258-64.
- Haussermann, S., Kittstein, W., Rincke, G., Johannes, F. J., Marks, F. and Gschwendt, M. (1999). "Proteolytic cleavage of protein kinase C $\mu$  upon induction of apoptosis in U937 cells." *FEBS Lett* **462**(3): 442-6.
- Hawes, B. E., Luttrell, L. M., van Biesen, T. and Lefkowitz, R. J. (1996). "Phosphatidylinositol 3-kinase is an early intermediate in the G $\beta$  gamma-mediated mitogen-activated protein kinase signaling pathway." *J Biol Chem* **271**(21): 12133-6.
- Hawes, B. E., van Biesen, T., Koch, W. J., Luttrell, L. M. and Lefkowitz, R. J. (1995). "Distinct pathways of Gi- and Gq-mediated mitogen-activated protein kinase activation." *J Biol Chem* **270**(29): 17148-53.
- Heck, D. and Sultan, F. (2002). "El cerebelo." *Investigación y Ciencia*: 6-14.
- Heine, C., Wegner, A., Grosche, J., Allgaier, C., Illes, P. and Franke, H. (2007). "P2 receptor expression in the dopaminergic system of the rat brain during development." *Neuroscience* **149**(1): 165-181.
- Herbert, M. R. and Caviness, V. S. (2006). *Neuroanatomy and imaging studies*. . London: Mac Keith Press.
- Herold, C. L., Qi, A. D., Harden, T. K. and Nicholas, R. A. (2004). "Agonist versus antagonist action of ATP at the P2Y<sub>4</sub> receptor is determined by the second extracellular loop." *J Biol Chem* **279**(12): 11456-64.
- Hervas, C., Perez-Sen, R. and Miras-Portugal, M. T. (2003). "Coexpression of functional P2X and P2Y nucleotide receptors in single cerebellar granule cells." *J Neurosci Res* **73**(3): 384-99.
- Hervas, C., Perez-Sen, R. and Miras-Portugal, M. T. (2005). "Presence of diverse functional P2X receptors in rat cerebellar synaptic terminals." *Biochem Pharmacol* **70**(5): 770-85.
- Hirrlinger, J., Hulsman, S. and Kirchhoff, F. (2004). "Astroglial processes show spontaneous motility at active synaptic terminals in situ." *Eur J Neurosci* **20**(8): 2235-9.
- Hoebertz, A., Mahendran, S., Burnstock, G. and Arnett, T. R. (2002). "ATP and UTP at low concentrations strongly inhibit bone formation by osteoblasts: a novel role for the P2Y<sub>2</sub> receptor in bone remodeling." *J Cell Biochem* **86**(3): 413-9.
- Hoffmann, C., Moro, S., Nicholas, R. A., Harden, T. K. and Jacobson, K. A. (1999). "The role of amino acids in extracellular loops of the human P2Y<sub>1</sub> receptor in surface expression and activation processes." *J Biol Chem* **274**(21): 14639-47.
- Hokkanen, L. S., Kauranen, V., Roine, R. O., Salonen, O. and Kotila, M. (2006). "Subtle cognitive deficits after cerebellar infarcts." *Eur J Neurol* **13**(2): 161-70.
- Holton, F. A. and Holton, P. (1953). "The possibility that ATP is a transmitter at sensory nerve endings." *J Physiol* **119**(4): 50P-51P.
- Holton, F. A. and Holton, P. (1954). "The capillary dilator substances in dry powders of spinal roots; a possible role of adenosine triphosphate in chemical transmission from nerve endings." *J Physiol* **126**(1): 124-40.
- Holton, P. (1959). "The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves." *J Physiol* **145**(3): 494-504.
- Hollopeter, G., Jantzen, H. M., Vincent, D., Li, G., England, L., Ramakrishnan, V., Yang, R. B., Nurden, P., Nurden, A., Julius, D. and Conley, P. B. (2001). "Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs." *Nature* **409**(6817): 202-7.
- Honda, S., Sasaki, Y., Ohsawa, K., Imai, Y., Nakamura, Y., Inoue, K. and Kohsaka, S. (2001). "Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors." *J Neurosci* **21**(6): 1975-82.
- Hou, M., Harden, T. K., Kuhn, C. M., Baldetorp, B., Lazarowski, E., Pendergast, W., Moller,

- S., Edvinsson, L. and Erlinge, D. (2002). "UDP acts as a growth factor for vascular smooth muscle cells by activation of P2Y(6) receptors." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **282**(2): H784-92.
- Hourani, S. M. and Hall, D. A. (1994). "Receptors for ADP on human blood platelets." *Trends Pharmacol Sci* **15**(4): 103-8.
- Housley, G. D., Luo, L. and Ryan, A. F. (1998). "Localization of mRNA encoding the P2X2 receptor subunit of the adenosine 5'-triphosphate-gated ion channel in the adult and developing rat inner ear by in situ hybridization." *J Comp Neurol* **393**(4): 403-14.
- Hoyle, C., Hilderman, R., Pintor, J., Schlüter, H. and King, B. (2001). "Diadenosine poliphosphates as extracellular signal molecules." *Drug Dev Res* 260-273.
- Hsuan, J. J., Minogue, S. and dos Santos, M. (1998). "Phosphoinositide 4- and 5-kinases and the cellular roles of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate." *Adv Cancer Res* **74**: 167-216.
- Hu, B., Senkler, C., Yang, A., Soto, F. and Liang, B. T. (2002). "P2X4 receptor is a glycosylated cardiac receptor mediating a positive inotropic response to ATP." *J Biol Chem* **277**(18): 15752-7.
- Huang, L. C., Ryan, A. F., Cockayne, D. A. and Housley, G. D. (2006). "Developmentally regulated expression of the P2X3 receptor in the mouse cochlea." *Histochem Cell Biol* **125**(6): 681-92.
- Huidobro-Toro, J. P., Lorca, R. A. and Coddou, C. (2007). "Trace metals in the brain: allosteric modulators of ligand-gated receptor channels, the case of ATP-gated P2X receptors." *Eur Biophys J*.
- Humphreys, B. D., Rice, J., Kertesz, S. B. and Dubyak, G. R. (2000). "Stress-activated protein kinase/JNK activation and apoptotic induction by the macrophage P2X7 nucleotide receptor." *J Biol Chem* **275**(35): 26792-8.
- Humphreys, B. D., Virginio, C., Surprenant, A., Rice, J. and Dubyak, G. R. (1998). "Isoquinolines as antagonists of the P2X7 nucleotide receptor: high selectivity for the human versus rat receptor homologues." *Mol Pharmacol* **54**(1): 22-32.
- Hurd, C. and Rozengurt, E. (2001). "Protein kinase D is sufficient to suppress EGF-induced c-Jun Ser 63 phosphorylation." *Biochem Biophys Res Commun* **282**(2): 404-8.
- Huwiler, A., Wartmann, M., van den Bosch, H. and Pfeilschifter, J. (2000). "Extracellular nucleotides activate the p38-stress-activated protein kinase cascade in glomerular mesangial cells." *Br J Pharmacol* **129**(3): 612-8.
- Iglesias, T., Cabrera-Poch, N., Mitchell, M. P., Naven, T. J., Rozengurt, E. and Schiavo, G. (2000). "Identification and cloning of Kidins220, a novel neuronal substrate of protein kinase D." *J Biol Chem* **275**(51): 40048-56.
- Iglesias, T., Waldron, R. T. and Rozengurt, E. (1998). "Identification of in vivo phosphorylation sites required for protein kinase D activation." *J Biol Chem* **273**(42): 27662-7.
- Ihara, H., Hirukawa, K., Goto, S. and Togari, A. (2005). "ATP-stimulated interleukin-6 synthesis through P2Y receptors on human osteoblasts." *Biochem Biophys Res Commun* **326**(2): 329-34.
- Inbe, H., Watanabe, S., Miyawaki, M., Tanabe, E. and Encinas, J. A. (2004). "Identification and characterization of a cell-surface receptor, P2Y15, for AMP and adenosine." *J Biol Chem* **279**(19): 19790-9.
- Ito, M. (2002). "The molecular organization of cerebellar long-term depression." *Nat Rev Neurosci* **3**(11): 896-902.
- Ivanov, A. A., Costanzi, S. and Jacobson, K. A. (2006). "Defining the nucleotide binding sites of P2Y receptors using rhodopsin-based homology modeling." *J Comput Aided*



*Mol Des* **20**(7-8): 417-26.

- Jacobson, K. A., Jarvis, M. F. and Williams, M. (2002). "Purine and pyrimidine (P2) receptors as drug targets." *J Med Chem* **45**(19): 4057-93.
- Jaggi, M., Rao, P. S., Smith, D. J., Wheelock, M. J., Johnson, K. R., Hemstreet, G. P. and Balaji, K. C. (2005). "E-cadherin phosphorylation by protein kinase D1/protein kinase C{mu} is associated with altered cellular aggregation and motility in prostate cancer." *Cancer Res* **65**(2): 483-92.
- Jamora, C., Yamanouye, N., Van Lint, J., Laudenslager, J., Vandenheede, J. R., Faulkner, D. J. and Malhotra, V. (1999). "Gbetagamma-mediated regulation of Golgi organization is through the direct activation of protein kinase D." *Cell* **98**(1): 59-68.
- Janssens, R., Paindavoine, P., Parmentier, M. and Boeynaems, J. M. (1999). "Human P2Y2 receptor polymorphism: identification and pharmacological characterization of two allelic variants." *Br J Pharmacol* **127**(3): 709-16.
- Jarvis, M. F., Burgard, E. C., McGaraughty, S., Honore, P., Lynch, K., Brennan, T. J., Subieta, A., Van Biesen, T., Cartmell, J., Bianchi, B., Niforatos, W., Kage, K., Yu, H., Mikusa, J., Wismer, C. T., Zhu, C. Z., Chu, K., Lee, C. H., Stewart, A. O., Polakowski, J., Cox, B. F., Kowaluk, E., Williams, M., Sullivan, J. and Faltynek, C. (2002). "A-317491, a novel potent and selective non-nucleotide antagonist of P2X3 and P2X2/3 receptors, reduces chronic inflammatory and neuropathic pain in the rat." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(26): 17179-84.
- Javitch, J. A. (2004). "The ants go marching two by two: oligomeric structure of G-protein-coupled receptors." *Mol Pharmacol* **66**(5): 1077-82.
- Jenkins, G. M. and Frohman, M. A. (2005). "Phospholipase D: a lipid centric review." *Cell Mol Life Sci* **62**(19-20): 2305-16.
- Jiang, L. H., Kim, M., Spelta, V., Bo, X., Surprenant, A. and North, R. A. (2003). "Subunit arrangement in P2X receptors." *J Neurosci* **23**(26): 8903-10.
- Jiang, L. H., Mackenzie, A. B., North, R. A. and Surprenant, A. (2000). "Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X(7) receptors." *Mol Pharmacol* **58**(1): 82-8.
- Jiang, L. H., Rassendren, F., Mackenzie, A., Zhang, Y. H., Surprenant, A. and North, R. A. (2005). "N-methyl-D-glucamine and propidium dyes utilize different permeation pathways at rat P2X(7) receptors." *Am J Physiol Cell Physiol* **289**(5): C1295-302.
- Jiang, L. H., Rassendren, F., Surprenant, A. and North, R. A. (2000). "Identification of amino acid residues contributing to the ATP-binding site of a purinergic P2X receptor." *J Biol Chem* **275**(44): 34190-6.
- Jimenez, A. I., Castro, E., Communi, D., Boeynaems, J. M., Delicado, E. G. and Miras-Portugal, M. T. (2000). "Coexpression of several types of metabotropic nucleotide receptors in single cerebellar astrocytes." *J Neurochem* **75**(5): 2071-9.
- Jimenez, A. I., Castro, E., Delicado, E. G. and Miras-Portugal, M. T. (1998). "Potentiation of adenosine 5'-triphosphate calcium responses by diadenosine pentaphosphate in individual rat cerebellar astrocytes." *Neurosci Lett* **246**(2): 109-11.
- Jimenez, A. I., Castro, E., Delicado, E. G. and Miras-Portugal, M. T. (2002). "Specific diadenosine pentaphosphate receptor coupled to extracellular regulated kinases in cerebellar astrocytes." *J Neurochem* **83**(2): 299-308.
- Jimenez, A. I., Castro, E., Mirabet, M., Franco, R., Delicado, E. G. and Miras-Portugal, M. T. (1999). "Potentiation of ATP calcium responses by A2B receptor stimulation and other signals coupled to Gs proteins in type-1 cerebellar astrocytes." *Glia* **26**(2): 119-28.
- Jo, Y. H. and Schlichter, R. (1999). "Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons." *Nat Neurosci* **2**(3): 241-5.

- Johannes, F. J., Hausser, A., Storz, P., Truckenmuller, L., Link, G., Kawakami, T. and Pfizenmaier, K. (1999). "Bruton's tyrosine kinase (Btk) associates with protein kinase C  $\mu$ ." *FEBS Lett* **461**(1-2): 68-72.
- Johannes, F. J., Horn, J., Link, G., Haas, E., Sieminski, K., Wajant, H. and Pfizenmaier, K. (1998). "Protein kinase C  $\mu$  downregulation of tumor-necrosis-factor-induced apoptosis correlates with enhanced expression of nuclear-factor-kappaB-dependent protective genes." *Eur J Biochem* **257**(1): 47-54.
- Jones, C. A., Vial, C., Sellers, L. A., Humphrey, P. P., Evans, R. J. and Chessell, I. P. (2004). "Functional regulation of P2X6 receptors by N-linked glycosylation: identification of a novel alpha beta-methylene ATP-sensitive phenotype." *Mol Pharmacol* **65**(4): 979-85.
- Kaiser, R. A. and Buxton, I. L. (2002). "Nucleotide-mediated relaxation in guinea-pig aorta: selective inhibition by MRS2179." *Br J Pharmacol* **135**(2): 537-45.
- Karni, R., Mizrachi, S., Reiss-Sklan, E., Gazit, A., Livnah, O. and Levitzki, A. (2003). "The pp60c-Src inhibitor PP1 is non-competitive against ATP." *FEBS Lett* **537**(1-3): 47-52.
- Kennedy, C., Assis, T. S., Currie, A. J. and Rowan, E. G. (2003). "Crossing the pain barrier: P2 receptors as targets for novel analgesics." *J Physiol* **553**(Pt 3): 683-94.
- Kennedy, C. and Leff, P. (1995). "How should P2X purinoceptors be classified pharmacologically?" *Trends Pharmacol Sci* **16**(5): 168-74.
- Khakh, B. S. and Egan, T. M. (2005). "Contribution of transmembrane regions to ATP-gated P2X2 channel permeability dynamics." *J Biol Chem* **280**(7): 6118-29.
- Khakh, B. S., Gittermann, D., Cockayne, D. A. and Jones, A. (2003). "ATP modulation of excitatory synapses onto interneurons." *J Neurosci* **23**(19): 7426-37.
- Kim, M., Jiang, L. H., Wilson, H. L., North, R. A. and Surprenant, A. (2001). "Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex." *Embo J* **20**(22): 6347-58.
- Kim, M., Spelta, V., Sim, J., North, R. A. and Surprenant, A. (2001). "Differential assembly of rat purinergic P2X7 receptor in immune cells of the brain and periphery." *J Biol Chem* **276**(26): 23262-7.
- Kim, Y. C., Lee, J. S., Sak, K., Marteau, F., Mamedova, L., Boeynaems, J. M. and Jacobson, K. A. (2005). "Synthesis of pyridoxal phosphate derivatives with antagonist activity at the P2Y13 receptor." *Biochem Pharmacol* **70**(2): 266-74.
- King, B. F. (2002). "2-Chloro-N6-methyl-(N)-methanocarba-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate is a selective high affinity P2Y1 receptor antagonist: commentary on Boyer et al." *Br J Pharmacol* **135**(8): 1839-40.
- King, B. F., Liu, M., Pintor, J., Gualix, J., Miras-Portugal, M. T. and Burnstock, G. (1999). "Diinosine pentaphosphate (IP5I) is a potent antagonist at recombinant rat P2X1 receptors." *Br J Pharmacol* **128**(5): 981-8.
- King, B. F., Neary, J. T., Zhu, Q., Wang, S., Norenberg, M. D. and Burnstock, G. (1996). "P2 purinoceptors in rat cortical astrocytes: expression, calcium-imaging and signalling studies." *Neuroscience* **74**(4): 1187-96.
- King, B. F. and Townsend-Nicholson, A. (2003). "Nucleotide and Nucleoside receptors." *Tocris Review* **23**: 1-12.
- King, B. F., Townsend-Nicholson, A., Wildman, S. S., Thomas, T., Spyer, K. M. and Burnstock, G. (2000). "Coexpression of rat P2X2 and P2X6 subunits in *Xenopus* oocytes." *J Neurosci* **20**(13): 4871-7.
- Klapperstuck, M., Buttner, C., Schmalzing, G. and Markwardt, F. (2001). "Functional evidence of distinct ATP activation sites at the human P2X(7) receptor." *J Physiol*

**534**(Pt 1): 25-35.

- Koizumi, S., Fujishita, K., Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y. and Inoue, K. (2003). "Dynamic inhibition of excitatory synaptic transmission by astrocyte-derived ATP in hippocampal cultures." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(19): 11023-8.
- Koizumi, S. and Inoue, K. (1997). "Inhibition by ATP of calcium oscillations in rat cultured hippocampal neurones." *Br J Pharmacol* **122**(1): 51-8.
- Koizumi, S., Shigemoto-Mogami, Y., Nasu-Tada, K., Shinozaki, Y., Ohsawa, K., Tsuda, M., Joshi, B. V., Jacobson, K. A., Kohsaka, S. and Inoue, K. (2007). "UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis." *Nature* **446**(7139): 1091-5.
- Kong, H., Boulter, J., Weber, J. L., Lai, C. and Chao, M. V. (2001). "An evolutionarily conserved transmembrane protein that is a novel downstream target of neurotrophin and ephrin receptors." *J Neurosci* **21**(1): 176-85.
- Kotevic, I., Kirschner, K. M., Porzig, H. and Baltensperger, K. (2005). "Constitutive interaction of the P2Y2 receptor with the hematopoietic cell-specific G protein G(alpha16) and evidence for receptor oligomers." *Cell Signal* **17**(7): 869-80.
- Kreft, M., Stenovec, M., Rupnik, M., Grilc, S., Krzan, M., Potokar, M., Pangrsic, T., Haydon, P. G. and Zorec, R. (2004). "Properties of Ca(2+)-dependent exocytosis in cultured astrocytes." *Glia* **46**(4): 437-45.
- Kukley, M., Barden, J. A., Steinhäuser, C. and Jabs, R. (2001). "Distribution of P2X receptors on astrocytes in juvenile rat hippocampus." *Glia* **36**(1): 11-21.
- Kukulski, F., Lévesque, S. A., Lavoie, É. G., Lecka, J., Bigonnesse, F., Knowles, A. F. and Robson, S. C. (2005). "Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8." *Purinergic Signalling* **1**: 193-204.
- Kunapuli, S. P. and Daniel, J. L. (1998). "P2 receptor subtypes in the cardiovascular system." *Biochem J* **336** ( Pt 3): 513-23.
- Laitinen, J. T., Uri, A., Raidaru, G. and Miettinen, R. (2001). "[<sup>35</sup>S]GTPgammaS autoradiography reveals a wide distribution of G(i/o)-linked ADP receptors in the nervous system: close similarities with the platelet P2Y(ADP) receptor." *J Neurochem* **77**(2): 505-18.
- Lambrecht, G., Braun, K., Damer, M., Ganso, M., Hildebrandt, C., Ullmann, H., Kassack, M. U. and Nickel, P. (2002). "Structure-activity relationships of suramin and pyridoxal-5'-phosphate derivatives as P2 receptor antagonists." *Curr Pharm Des* **8**(26): 2371-99.
- Lambrecht, G., Friebe, T., Grimm, U., Windscheif, U., Bungardt, E., Hildebrandt, C., Baumert, H. G., Spatz-Kumbel, G. and Mutschler, E. (1992). "PPADS, a novel functionally selective antagonist of P2 purinoceptor-mediated responses." *Eur J Pharmacol* **217**(2-3): 217-9.
- Lazarowski, E. R., Boucher, R. C. and Harden, T. K. (2003). "Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules." *Mol Pharmacol* **64**(4): 785-95.
- Le Feuvre, R., Brough, D. and Rothwell, N. (2002). "Extracellular ATP and P2X7 receptors in neurodegeneration." *Eur J Pharmacol* **447**(2-3): 261-9.
- Le, K. T., Babinski, K. and Seguela, P. (1998). "Central P2X4 and P2X6 channel subunits coassemble into a novel heteromeric ATP receptor." *J Neurosci* **18**(18): 7152-9.
- Le, K. T., Boue-Grabot, E., Archambault, V. and Seguela, P. (1999). "Functional and biochemical evidence for heteromeric ATP-gated channels composed of P2X1 and P2X5 subunits." *J Biol Chem* **274**(22): 15415-9.
- Le, K. T., Paquet, M., Nouel, D., Babinski, K. and Seguela, P. (1997). "Primary structure and expression of a naturally truncated human P2X ATP receptor subunit from brain and

- immune system." *FEBS Lett* **418**(1-2): 195-9.
- Lechner, S. G., Dorostkar, M. M., Mayer, M., Edelbauer, H., Pankevych, H. and Boehm, S. (2004). "Autoinhibition of transmitter release from PC12 cells and sympathetic neurons through a P2Y receptor-mediated inhibition of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels." *Eur J Neurosci* **20**(11): 2917-28.
- Lee, B. C., Cheng, T., Adams, G. B., Attar, E. C., Miura, N., Lee, S. B., Saito, Y., Olszak, I., Dombkowski, D., Olson, D. P., Hancock, J., Choi, P. S., Haber, D. A., Luster, A. D. and Scadden, D. T. (2003). "P2Y-like receptor, GPR105 (P2Y14), identifies and mediates chemotaxis of bone-marrow hematopoietic stem cells." *Genes Dev* **17**(13): 1592-604.
- Lee, F. J., Xue, S., Pei, L., Vukusic, B., Chery, N., Wang, Y., Wang, Y. T., Niznik, H. B., Yu, X. M. and Liu, F. (2002). "Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor." *Cell* **111**(2): 219-30.
- Lee, S. Y., Wolff, S. C., Nicholas, R. A. and O'Grady, S. M. (2003). "P2Y receptors modulate ion channel function through interactions involving the C-terminal domain." *Mol Pharmacol* **63**(4): 878-85.
- Lenz, G., Gottfried, C., Luo, Z., Avruch, J., Rodnight, R., Nie, W. J., Kang, Y. and Neary, J. T. (2000). "P(2Y) purinoceptor subtypes recruit different mek activators in astrocytes." *Br J Pharmacol* **129**(5): 927-36.
- Leon, D., Hervas, C. and Miras-Portugal, M. T. (2006). "P2Y1 and P2X7 receptors induce calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation in cerebellar granule neurons." *Eur J Neurosci* **23**(11): 2999-3013.
- Leon, D., Sanchez-Nogueiro, J., Marin-Garcia, P. and Miras-Portugal, M. A. (2007). "Glutamate release and synapsin-I phosphorylation induced by P2X(7) receptors activation in cerebellar granule neurons." *Neurochem Int*.
- Lewis, C., Neidhart, S., Holy, C., North, R. A., Buell, G. and Surprenant, A. (1995). "Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons." *Nature* **377**(6548): 432-5.
- Li, Q., Luo, X., Zeng, W. and Muallem, S. (2003). "Cell-specific behavior of P2X7 receptors in mouse parotid acinar and duct cells." *J Biol Chem* **278**(48): 47554-61.
- Li, Z., Migita, K., Samways, D. S., Voigt, M. M. and Egan, T. M. (2004). "Gain and loss of channel function by alanine substitutions in the transmembrane segments of the rat ATP-gated P2X2 receptor." *J Neurosci* **24**(33): 7378-86.
- Liljedahl, M., Maeda, Y., Colanzi, A., Ayala, I., Van Lint, J. and Malhotra, V. (2001). "Protein kinase D regulates the fission of cell surface destined transport carriers from the trans-Golgi network." *Cell* **104**(3): 409-20.
- Lin, J. H., Takano, T., Arcuino, G., Wang, X., Hu, F., Darzynkiewicz, Z., Nunes, M., Goldman, S. A. and Nedergaard, M. (2007). "Purinergic signaling regulates neural progenitor cell expansion and neurogenesis." *Dev Biol* **302**(1): 356-66.
- Linden, D. J. (2003). "Neuroscience. From molecules to memory in the cerebellum." *Science* **301**(5640): 1682-5.
- Liu, F., Wan, Q., Pristupa, Z. B., Yu, X. M., Wang, Y. T. and Niznik, H. B. (2000). "Direct protein-protein coupling enables cross-talk between dopamine D5 and gamma-aminobutyric acid A receptors." *Nature* **403**(6767): 274-80.
- Liu, X., Surprenant, A., Mao, H. J., Roger, S., Xia, R., Bradley, H. and Jiang, L. H. (2008). "Identification of key residues coordinating functional inhibition of P2X7 receptors by zinc and copper." *Mol Pharmacol* **73**(1): 252-9.
- Locovei, S., Bao, L. and Dahl, G. (2006). "Pannexin 1 in erythrocytes: function without a gap." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(20): 7655-9.



- Loesch, A. and Burnstock, G. (1998). "Electron-immunocytochemical localization of P2X1 receptors in the rat cerebellum." *Cell Tissue Res* **294**(2): 253-60.
- Lorca, R. A., Coddou, C., Gazitua, M. C., Bull, P., Arredondo, C. and Huidobro-Toro, J. P. (2005). "Extracellular histidine residues identify common structural determinants in the copper/zinc P2X2 receptor modulation." *J Neurochem* **95**(2): 499-512.
- Luthje, J. and Ogilvie, A. (1983). "The presence of diadenosine 5',5''-P1,P3-triphosphate (Ap3A) in human platelets." *Biochem Biophys Res Commun* **115**(1): 253-60.
- Luttrell, L. M., Della Rocca, G. J., van Biesen, T., Luttrell, D. K. and Lefkowitz, R. J. (1997). "Gbetagamma subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. A scaffold for G protein-coupled receptor-mediated Ras activation." *J Biol Chem* **272**(7): 4637-44.
- Lynch, K. J., Touma, E., Niforatos, W., Kage, K. L., Burgard, E. C., van Biesen, T., Kowaluk, E. A. and Jarvis, M. F. (1999). "Molecular and functional characterization of human P2X(2) receptors." *Mol Pharmacol* **56**(6): 1171-81.
- Mahaut-Smith, M. P., Tolhurst, G. and Evans, R. J. (2004). "Emerging roles for P2X1 receptors in platelet activation." *Platelets* **15**(3): 131-44.
- Major, D. T. and Fischer, B. (2004). "Molecular recognition in purinergic receptors. 1. A comprehensive computational study of the h-P2Y1-receptor." *J Med Chem* **47**(18): 4391-404.
- Mamedova, L. K., Gao, Z. G. and Jacobson, K. A. (2006). "Regulation of death and survival in astrocytes by ADP activating P2Y1 and P2Y12 receptors." *Biochem Pharmacol* **72**(8): 1031-41.
- Marteau, F., Communi, D., Boeynaems, J. M. and Suarez Gonzalez, N. (2004). "Involvement of multiple P2Y receptors and signaling pathways in the action of adenine nucleotides diphosphates on human monocyte-derived dendritic cells." *J Leukoc Biol* **76**(4): 796-803.
- Marteau, F., Le Poul, E., Communi, D., Communi, D., Labouret, C., Savi, P., Boeynaems, J. M. and Gonzalez, N. S. (2003). "Pharmacological characterization of the human P2Y13 receptor." *Mol Pharmacol* **64**(1): 104-12.
- Mateo, J., Garcia-Lecea, M., Miras-Portugal, M. T. and Castro, E. (1998). "Ca<sup>2+</sup> signals mediated by P2X-type purinoceptors in cultured cerebellar Purkinje cells." *J Neurosci* **18**(5): 1704-12.
- Mateo, J., Miras-Portugal, M. T. and Castro, E. (1996). "Co-existence of P2Y- and PPADS-insensitive P2U-purinoceptors in endothelial cells from adrenal medulla." *Br J Pharmacol* **119**(6): 1223-32.
- Matos, J. E., Robaye, B., Boeynaems, J. M., Beauwens, R. and Leipziger, J. (2005). "K<sup>+</sup> secretion activated by luminal P2Y2 and P2Y4 receptors in mouse colon." *J Physiol* **564**(Pt 1): 269-79.
- Matthews, S., Iglesias, T., Cantrell, D. and Rozengurt, E. (1999). "Dynamic re-distribution of protein kinase D (PKD) as revealed by a GFP-PKD fusion protein: dissociation from PKD activation." *FEBS Lett* **457**(3): 515-21.
- Matthews, S. A., Dayalu, R., Thompson, L. J. and Scharenberg, A. M. (2003). "Regulation of protein kinase C $\eta$  by the B-cell antigen receptor." *J Biol Chem* **278**(11): 9086-91.
- Matthews, S. A., Iglesias, T., Rozengurt, E. and Cantrell, D. (2000). "Spatial and temporal regulation of protein kinase D (PKD)." *Embo J* **19**(12): 2935-45.
- Mauch, D. H., Nagler, K., Schumacher, S., Goritz, C., Muller, E. C., Otto, A. and Pfrieder, F. W. (2001). "CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol." *Science* **294**(5545): 1354-7.
- McCarthy, K. D. and de Vellis, J. (1980). "Preparation of separate astroglial and

- oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue.” *J Cell Biol* **85**(3): 890-902.
- Mei, Q. and Liang, B. T. (2001). “P2 purinergic receptor activation enhances cardiac contractility in isolated rat and mouse hearts.” *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**(1): H334-41.
- Mellor, E. A., Frank, N., Soler, D., Hodge, M. R., Lora, J. M., Austen, K. F. and Boyce, J. A. (2003). “Expression of the type 2 receptor for cysteinyl leukotrienes (CysLT2R) by human mast cells: Functional distinction from CysLT1R.” *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(20): 11589-93.
- Mellor, E. A., Maekawa, A., Austen, K. F. and Boyce, J. A. (2001). “Cysteinyl leukotriene receptor 1 is also a pyrimidinergic receptor and is expressed by human mast cells.” *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(14): 7964-9.
- Merkle, F. T. and Alvarez-Buylla, A. (2006). “Neural stem cells in mammalian development.” *Curr Opin Cell Biol* **18**(6): 704-9.
- Merkle, F. T., Tramontin, A. D., Garcia-Verdugo, J. M. and Alvarez-Buylla, A. (2004). “Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone.” *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(50): 17528-32.
- Merlo, D. and Volonte, C. (1996). “Binding and functions of extracellular ATP in cultured cerebellar granule neurons.” *Biochem Biophys Res Commun* **225**(3): 907-14.
- Milosevic, J., Brandt, A., Roemuss, U., Arnold, A., Wegner, F., Schwarz, S. C., Storch, A., Zimmermann, H. and Schwarz, J. (2006). “Uracil nucleotides stimulate human neural precursor cell proliferation and dopaminergic differentiation: involvement of MEK/ERK signalling.” *J Neurochem* **99**(3): 913-23.
- Miller, R. F. (2004). “D-Serine as a glial modulator of nerve cells.” *Glia* **47**(3): 275-83.
- Miller, R. H. (1996). “Oligodendrocyte origins.” *Trends Neurosci* **19**(3): 92-6.
- Miras-Portugal, M. T., Diaz-Hernandez, M., Giraldez, L., Hervas, C., Gomez-Villafuertes, R., Sen, R. P., Gualix, J. and Pintor, J. (2003). “P2X7 receptors in rat brain: presence in synaptic terminals and granule cells.” *Neurochem Res* **28**(10): 1597-605.
- Mishra, S. K., Braun, N., Shukla, V., Fullgrabe, M., Schomerus, C., Korf, H. W., Gachet, C., Ikehara, Y., Seigny, J., Robson, S. C. and Zimmermann, H. (2006). “Extracellular nucleotide signaling in adult neural stem cells: synergism with growth factor-mediated cellular proliferation.” *Development* **133**(4): 675-84.
- Mitchell, S. J. and Silver, R. A. (2000). “Glutamate spillover suppresses inhibition by activating presynaptic mGluRs.” *Nature* **404**(6777): 498-502.
- Mongin, A. A. and Kimelberg, H. K. (2005). “ATP regulates anion channel-mediated organic osmolyte release from cultured rat astrocytes via multiple Ca<sup>2+</sup>-sensitive mechanisms.” *Am J Physiol Cell Physiol* **288**(1): C204-13.
- Mori, M., Heuss, C., Gähwiler, B. H. and Gerber, U. (2001). “Fast synaptic transmission mediated by P2X receptors in CA3 pyramidal cells of rat hippocampal slice cultures.” *J Physiol* **535**(Pt 1): 115-23.
- Moriyama, T., Iida, T., Kobayashi, K., Higashi, T., Fukuoka, T., Tsumura, H., Leon, C., Suzuki, N., Inoue, K., Gachet, C., Noguchi, K. and Tominaga, M. (2003). “Possible involvement of P2Y2 metabotropic receptors in ATP-induced transient receptor potential vanilloid receptor 1-mediated thermal hypersensitivity.” *J Neurosci* **23**(14): 6058-62.
- Mosbacher, J., Maier, R., Fakler, B., Glatz, A., Crespo, J. and Bilbe, G. (1998). “P2Y receptor subtypes differentially couple to inwardly-rectifying potassium channels.” *FEBS Lett* **436**(1): 104-10.
- Motte, S., Communi, D., Pirotton, S. and Boeynaems, J. M. (1995). “Involvement of multiple receptors in the actions of extracellular ATP: the example of vascular endothelial

- cells." *Int J Biochem Cell Biol* **27**(1): 1-7.
- Mulryan, K., Gitterman, D. P., Lewis, C. J., Vial, C., Leckie, B. J., Cobb, A. L., Brown, J. E., Conley, E. C., Buell, G., Pritchard, C. A. and Evans, R. J. (2000). "Reduced vas deferens contraction and male infertility in mice lacking P2X1 receptors." *Nature* **403**(6765): 86-9.
- Mulligan, S. J. and MacVicar, B. A. (2004). "Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions." *Nature* **431**(7005): 195-9.
- Murgia, M., Hanau, S., Pizzo, P., Rippa, M. and Di Virgilio, F. (1993). "Oxidized ATP. An irreversible inhibitor of the macrophage purinergic P2Z receptor." *J Biol Chem* **268**(11): 8199-203.
- Nagaya, N., Tittle, R. K., Saar, N., Dellal, S. S. and Hume, R. I. (2005). "An intersubunit zinc binding site in rat P2X2 receptors." *J Biol Chem* **280**(28): 25982-93.
- Nakazawa, K., Inoue, K. and Ohno, Y. (1998). "An asparagine residue regulating conductance through P2X2 receptor/channels." *Eur J Pharmacol* **347**(1): 141-4.
- Nakazawa, K. and Ohno, Y. (1999). "Neighboring glycine residues are essential for P2X2 receptor/channel function." *Eur J Pharmacol* **370**(3): R5-6.
- Nakazawa, K., Ojima, H., Ishii-Nozawa, R., Takeuchi, K. and Ohno, Y. (2004). "Amino acid substitutions from an indispensable disulfide bond affect P2X2 receptor activation." *Eur J Pharmacol* **483**(1): 29-35.
- Nasu-Tada, K., Koizumi, S. and Inoue, K. (2005). "Involvement of beta1 integrin in microglial chemotaxis and proliferation on fibronectin: different regulations by ADP through PKA." *Glia* **52**(2): 98-107.
- Nawa, G., Urano, T., Tokino, T., Ochi, T. and Miyoshi, Y. (1998). "Cloning and characterization of the murine P2XM receptor gene." *J Hum Genet* **43**(4): 262-7.
- Neary, J. T., Kang, Y., Bu, Y., Yu, E., Akong, K. and Peters, C. M. (1999). "Mitogenic signaling by ATP/P2Y purinergic receptors in astrocytes: involvement of a calcium-independent protein kinase C, extracellular signal-regulated protein kinase pathway distinct from the phosphatidylinositol-specific phospholipase C/calcium pathway." *J Neurosci* **19**(11): 4211-20.
- Nett, W. J., Oloff, S. H. and McCarthy, K. D. (2002). "Hippocampal astrocytes in situ exhibit calcium oscillations that occur independent of neuronal activity." *J Neurophysiol* **87**(1): 528-37.
- Newbolt, A., Stoop, R., Virginio, C., Surprenant, A., North, R. A., Buell, G. and Rassendren, F. (1998). "Membrane topology of an ATP-gated ion channel (P2X receptor)." *J Biol Chem* **273**(24): 15177-82.
- Newman, E. A. (1996). "Acid efflux from retinal glial cells generated by sodium bicarbonate cotransport." *J Neurosci* **16**(1): 159-68.
- Newman, E. A. (2003). "New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission." *Trends Neurosci* **26**(10): 536-42.
- Nguyen, T., Erb, L., Weisman, G. A., Marchese, A., Heng, H. H., Garrad, R. C., George, S. R., Turner, J. T. and O'Dowd, B. F. (1995). "Cloning, expression, and chromosomal localization of the human uridine nucleotide receptor gene." *J Biol Chem* **270**(52): 30845-8.
- Nicke, A., Baumert, H. G., Rettinger, J., Eichele, A., Lambrecht, G., Mutschler, E. and Schmalzing, G. (1998). "P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels." *Embo J* **17**(11): 3016-28.
- Nicholas, R. A., Watt, W. C., Lazarowski, E. R., Li, Q. and Harden, K. (1996). "Uridine nucleotide selectivity of three phospholipase C-activating P2 receptors: identification of a UDP-selective, a UTP-selective, and an ATP- and UTP-specific receptor." *Mol*

- Pharmacol* **50**(2): 224-9.
- Nieber, K., Poelchen, W. and Illes, P. (1997). "Role of ATP in fast excitatory synaptic potentials in locus coeruleus neurones of the rat." *Br J Pharmacol* **122**(3): 423-30.
- Nishikawa, K., Toker, A., Wong, K., Marignani, P. A., Johannes, F. J. and Cantley, L. C. (1998). "Association of protein kinase C $\mu$  with type II phosphatidylinositol 4-kinase and type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase." *J Biol Chem* **273**(36): 23126-33.
- Noguchi, K., Ishii, S. and Shimizu, T. (2003). "Identification of p2y9/GPR23 as a novel G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid, structurally distant from the Edg family." *J Biol Chem* **278**(28): 25600-6.
- North, R. A. (2002). "Molecular physiology of P2X receptors." *Physiol Rev* **82**(4): 1013-67.
- O'Connor, S. E., Dainty, I. A. and Leff, P. (1991). "Further subclassification of ATP receptors based on agonist studies." *Trends Pharmacol Sci* **12**(4): 137-41.
- Ogata, K. and Kosaka, T. (2002). "Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hippocampus." *Neuroscience* **113**(1): 221-33.
- Oh, P. and Schnitzer, J. E. (2001). "Segregation of heterotrimeric G proteins in cell surface microdomains. G(q) binds caveolin to concentrate in caveolae, whereas G(i) and G(s) target lipid rafts by default." *Mol Biol Cell* **12**(3): 685-98.
- Ohsawa, K., Irino, Y., Nakamura, Y., Akazawa, C., Inoue, K. and Kohsaka, S. (2007). "Involvement of P2X4 and P2Y12 receptors in ATP-induced microglial chemotaxis." *Glia* **55**(6): 604-16.
- Okajima, F., Tokumitsu, Y., Kondo, Y. and Ui, M. (1987). "P2-purinergic receptors are coupled to two signal transduction systems leading to inhibition of cAMP generation and to production of inositol trisphosphate in rat hepatocytes." *J Biol Chem* **262**(28): 13483-90.
- Omatsu-Kanbe, M., Inoue, K., Fujii, Y., Yamamoto, T., Isono, T., Fujita, N. and Matsuura, H. (2006). "Effect of ATP on preadipocyte migration and adipocyte differentiation by activating P2Y receptors in 3T3-L1 cells." *Biochem J* **393**(Pt 1): 171-80.
- Ormond, S. J., Barrera, N. P., Qureshi, O. S., Henderson, R. M., Edwardson, J. M. and Murrell-Lagnado, R. D. (2006). "An uncharged region within the N terminus of the P2X6 receptor inhibits its assembly and exit from the endoplasmic reticulum." *Mol Pharmacol* **69**(5): 1692-700.
- Ortega, F., Perez-Sen, R. and Miras-Portugal, M. T. (2008). "Gi-coupled P2Y-ADP receptor mediates GSK-3 phosphorylation and beta-catenin nuclear translocation in granule neurons." *J Neurochem* **104**(1): 62-73.
- Oury, C., Toth-Zsamboki, E., Vermylen, J. and Hoylaerts, M. F. (2002). "P2X(1)-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase 2 contributes to platelet secretion and aggregation induced by collagen." *Blood* **100**(7): 2499-505.
- Palmer, R. K., Boyer, J. L., Schachter, J. B., Nicholas, R. A. and Harden, T. K. (1998). "Agonist action of adenosine triphosphates at the human P2Y1 receptor." *Mol Pharmacol* **54**(6): 1118-23.
- Panchin, Y. V. (2005). "Evolution of gap junction proteins--the pannexin alternative." *J Exp Biol* **208**(Pt 8): 1415-9.
- Panenka, W., Jijon, H., Herx, L. M., Armstrong, J. N., Feighan, D., Wei, T., Yong, V. W., Ransohoff, R. M. and MacVicar, B. A. (2001). "P2X7-like receptor activation in astrocytes increases chemokine monocyte chemoattractant protein-1 expression via mitogen-activated protein kinase." *J Neurosci* **21**(18): 7135-42.
- Pangrsic, T., Potokar, M., Stenovec, M., Kreft, M., Fabbretti, E., Nistri, A., Pryazhnikov, E.,



- Khiroug, L., Giniatullin, R. and Zorec, R. (2007). "Exocytotic release of ATP from cultured astrocytes." *J Biol Chem* **282**(39): 28749-58.
- Pankratov, Y., Castro, E., Miras-Portugal, M. T. and Krishtal, O. (1998). "A purinergic component of the excitatory postsynaptic current mediated by P2X receptors in the CA1 neurons of the rat hippocampus." *Eur J Neurosci* **10**(12): 3898-902.
- Parri, H. R., Gould, T. M. and Crunelli, V. (2001). "Spontaneous astrocytic Ca<sup>2+</sup> oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation." *Nat Neurosci* **4**(8): 803-12.
- Parri, R. and Crunelli, V. (2003). "An astrocyte bridge from synapse to blood flow." *Nat Neurosci* **6**(1): 5-6.
- Parvathenani, L. K., Tertyshnikova, S., Greco, C. R., Roberts, S. B., Robertson, B. and Posmantur, R. (2003). "P2X7 mediates superoxide production in primary microglia and is up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease." *J Biol Chem* **278**(15): 13309-17.
- Pasti, L., Zonta, M., Pozzan, T., Vicini, S. and Carmignoto, G. (2001). "Cytosolic calcium oscillations in astrocytes may regulate exocytotic release of glutamate." *J Neurosci* **21**(2): 477-84.
- Patel, M. K., Khakh, B. S. and Henderson, G. (2001). "Properties of native P2X receptors in rat trigeminal mesencephalic nucleus neurones: lack of correlation with known, heterologously expressed P2X receptors." *Neuropharmacology* **40**(1): 96-105.
- Paul, B. Z., Daniel, J. L. and Kunapuli, S. P. (1999). "Platelet shape change is mediated by both calcium-dependent and -independent signaling pathways. Role of p160 Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase in platelet shape change." *J Biol Chem* **274**(40): 28293-300.
- Pelegrin, P. and Surprenant, A. (2006). "Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 $\beta$  release by the ATP-gated P2X7 receptor." *Embo J* **25**(21): 5071-82.
- Pelegrin, P. and Surprenant, A. (2007). "Pannexin-1 couples to maitotoxin- and nigericin-induced interleukin-1 $\beta$  release through a dye uptake-independent pathway." *J Biol Chem* **282**(4): 2386-94.
- Perea, G. and Araque, A. (2005). "Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes." *J Neurosci* **25**(9): 2192-203.
- Perez-Andres, E., Fernandez-Rodriguez, M., Gonzalez, M., Zubiaga, A., Vallejo, A., Garcia, I., Matute, C., Pochet, S., Dehaye, J. P., Trueba, M., Marino, A. and Gomez-Munoz, A. (2002). "Activation of phospholipase D-2 by P2X(7) agonists in rat submandibular gland acini." *J Lipid Res* **43**(8): 1244-55.
- Pike, L. J. (2003). "Lipid rafts: bringing order to chaos." *J Lipid Res* **44**(4): 655-67.
- Pillois, X., Chaulet, H., Belloc, I., Dupuch, F., Desgranges, C. and Gadeau, A. P. (2002). "Nucleotide receptors involved in UTP-induced rat arterial smooth muscle cell migration." *Circ Res* **90**(6): 678-81.
- Pintor, J., Kowalewsky, H. J., Torres, M., Miras-Portugal, M. T. and Zimmermann, H. (1992). "Synaptic vesicle storage of diadenosine polyphosphates in the *Torpedo* electric organ." *Neurosci Res Commun* **10**: 9-15.
- Pintor, J. and Miras-Portugal, M. T. (1995). "A novel receptor for diadenosine polyphosphates coupled to calcium increase in rat midbrain synaptosomes." *Br J Pharmacol* **115**(6): 895-902.
- Pintor, J., Peral, A., Hoyle, C. H., Redick, C., Douglass, J., Sims, I. and Yerxa, B. (2002). "Effects of diadenosine polyphosphates on tear secretion in New Zealand white rabbits." *J Pharmacol Exp Ther* **300**(1): 291-7.

- Pintor, J., Rotllan, P., Torres, M. and Miras-Portugal, M. T. (1992). "Characterization and quantification of diadenosine hexaphosphate in chromaffin cells: granular storage and secretagogue-induced release." *Anal Biochem* **200**(2): 296-300.
- Pintor, J., Torres, M., Castro, E. and Miras-Portugal, M. T. (1991). "Characterization of diadenosine tetraphosphate (Ap<sub>4</sub>A) binding sites in cultured chromaffin cells: evidence for a P<sub>2</sub>y site." *Br J Pharmacol* **103**(4): 1980-4.
- Pochet, S., Gomez-Munoz, A., Marino, A. and Dehay, J. P. (2003). "Regulation of phospholipase D by P<sub>2</sub>X<sub>7</sub> receptors in submandibular ductal cells." *Cell Signal* **15**(10): 927-35.
- Porter, J. T. and McCarthy, K. D. (1997). "Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo." *Prog Neurobiol* **51**(4): 439-55.
- Prigozhina, N. L. and Waterman-Storer, C. M. (2004). "Protein kinase D-mediated anterograde membrane trafficking is required for fibroblast motility." *Curr Biol* **14**(2): 88-98.
- Qi, A. D., Zambon, A. C., Insel, P. A. and Nicholas, R. A. (2001). "An arginine/glutamine difference at the juxtaposition of transmembrane domain 6 and the third extracellular loop contributes to the markedly different nucleotide selectivities of human and canine P<sub>2</sub>Y<sub>11</sub> receptors." *Mol Pharmacol* **60**(6): 1375-82.
- Qiang, Y. W., Yao, L., Tosato, G. and Rudikoff, S. (2004). "Insulin-like growth factor I induces migration and invasion of human multiple myeloma cells." *Blood* **103**(1): 301-8.
- Quinton, T. M., Kim, S., Jin, J. and Kunapuli, S. P. (2005). "Lipid rafts are required in G<sub>α</sub>(i) signaling downstream of the P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub> receptor during ADP-mediated platelet activation." *J Thromb Haemost* **3**(5): 1036-41.
- Raffaghello, L., Chiozzi, P., Falzoni, S., Di Virgilio, F. and Pistoia, V. (2006). "The P<sub>2</sub>X<sub>7</sub> receptor sustains the growth of human neuroblastoma cells through a substance P-dependent mechanism." *Cancer Res* **66**(2): 907-14.
- Ralevic, V. and Burnstock, G. (1998). "Receptors for purines and pyrimidines." *Pharmacol Rev* **50**(3): 413-92.
- Reisin, I. L., Prat, A. G., Abraham, E. H., Amara, J. F., Gregory, R. J., Ausiello, D. A. and Cantiello, H. F. (1994). "The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a dual ATP and chloride channel." *J Biol Chem* **269**(32): 20584-91.
- Ren, J., Bian, X., DeVries, M., Schnegelsberg, B., Cockayne, D. A., Ford, A. P. and Galligan, J. J. (2003). "P<sub>2</sub>X<sub>2</sub> subunits contribute to fast synaptic excitation in myenteric neurons of the mouse small intestine." *J Physiol* **552**(Pt 3): 809-21.
- Rennecke, J., Rehberger, P. A., Furstenberger, G., Johannes, F. J., Stohr, M., Marks, F. and Richter, K. H. (1999). "Protein-kinase-C $\alpha$  expression correlates with enhanced keratinocyte proliferation in normal and neoplastic mouse epidermis and in cell culture." *Int J Cancer* **80**(1): 98-103.
- Rettinger, J. and Schmalzing, G. (2004). "Desensitization masks nanomolar potency of ATP for the P<sub>2</sub>X<sub>1</sub> receptor." *J Biol Chem* **279**(8): 6426-33.
- Rey, O., Yuan, J., Young, S. H. and Rozengurt, E. (2003). "Protein kinase C  $\alpha$ /protein kinase D3 nuclear localization, catalytic activation, and intracellular redistribution in response to G protein-coupled receptor agonists." *J Biol Chem* **278**(26): 23773-85.
- Richardson, P. J. and Brown, S. J. (1987). "ATP release from affinity-purified rat cholinergic nerve terminals." *J Neurochem* **48**(2): 622-30.
- Riol-Blanco, L., Iglesias, T., Sanchez-Sanchez, N., de la Rosa, G., Sanchez-Ruiloba, L., Cabrera-Poch, N., Torres, A., Longo, I., Garcia-Bordas, J., Longo, N., Tejedor, A., Sanchez-Mateos, P. and Rodriguez-Fernandez, J. L. (2004). "The neuronal protein Kidins220 localizes in a raft compartment at the leading edge of motile immature

- dendritic cells.” *Eur J Immunol* **34**(1): 108-18.
- Ristich, V. L., Bowman, P. H., Dodd, M. E. and Bollag, W. B. (2006). “Protein kinase D distribution in normal human epidermis, basal cell carcinoma and psoriasis.” *Br J Dermatol* **154**(4): 586-93.
- Robaye, B., Ghanem, E., Wilkin, F., Fokan, D., Van Driessche, W., Schurmans, S., Boeynaems, J. M. and Beauwens, R. (2003). “Loss of nucleotide regulation of epithelial chloride transport in the jejunum of P2Y4-null mice.” *Mol Pharmacol* **63**(4): 777-83.
- Roberts, J. A. and Evans, R. J. (2004). “ATP binding at human P2X1 receptors. Contribution of aromatic and basic amino acids revealed using mutagenesis and partial agonists.” *J Biol Chem* **279**(10): 9043-55.
- Roberts, J. A., Vial, C., Digby, H. R., Agboh, K. C., Wen, H., Atterbury-Thomas, A. and Evans, R. J. (2006). “Molecular properties of P2X receptors.” *Pflugers Arch* **452**(5): 486-500.
- Robson, S. C., Sévigny, J. and Zimmermann, H. (2006). “The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance.” *Purinergic Signalling* **2**(2): 409-430.
- Rocheville, M., Lange, D. C., Kumar, U., Patel, S. C., Patel, R. C. and Patel, Y. C. (2000). “Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity.” *Science* **288**(5463): 154-7.
- Rodriguez-Moreno, A. and Lerma, J. (1998). “Kainate receptor modulation of GABA release involves a metabotropic function.” *Neuron* **20**(6): 1211-8.
- Rodriguez-Pascual, F., Cortes, R., Torres, M., Palacios, J. M. and Miras-Portugal, M. T. (1997). “Distribution of [3H]diadenosine tetraphosphate binding sites in rat brain.” *Neuroscience* **77**(1): 247-55.
- Rodriguez del Castillo, A., Torres, M., Delicado, E. G. and Miras-Portugal, M. T. (1988). “Subcellular distribution studies of diadenosine polyphosphates--Ap4A and Ap5A--in bovine adrenal medulla: presence in chromaffin granules.” *J Neurochem* **51**(6): 1696-703.
- Rong, W., Gourine, A. V., Cockayne, D. A., Xiang, Z., Ford, A. P., Spyer, K. M. and Burnstock, G. (2003). “Pivotal role of nucleotide P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channel mediating ventilatory responses to hypoxia.” *J Neurosci* **23**(36): 11315-21.
- Royle, S. J., Qureshi, O. S., Bobanovic, L. K., Evans, P. R., Owen, D. J. and Murrell-Lagnado, R. D. (2005). “Non-canonical YXXGPhi endocytic motifs: recognition by AP2 and preferential utilization in P2X4 receptors.” *J Cell Sci* **118**(Pt 14): 3073-80.
- Rozas, J. L., Paternain, A. V. and Lerma, J. (2003). “Noncanonical signaling by ionotropic kainate receptors.” *Neuron* **39**(3): 543-53.
- Rozengurt, E., Rey, O. and Waldron, R. T. (2005). “Protein kinase D signaling.” *J Biol Chem* **280**(14): 13205-8.
- Rubio, M. E. and Soto, F. (2001). “Distinct Localization of P2X receptors at excitatory postsynaptic specializations.” *J Neurosci* **21**(2): 641-53.
- Rykx, A., De Kimpe, L., Mikhalap, S., Vantus, T., Seufferlein, T., Vandenhede, J. R. and Van Lint, J. (2003). “Protein kinase D: a family affair.” *FEBS Lett* **546**(1): 81-6.
- Sabala, P., Czajkowski, R., Przybylek, K., Kalita, K., Kaczmarek, L. and Baranska, J. (2001). “Two subtypes of G protein-coupled nucleotide receptors, P2Y(1) and P2Y(2) are involved in calcium signalling in glioma C6 cells.” *Br J Pharmacol* **132**(2): 393-402.
- Salter, M. W., De Koninck, Y. and Henry, J. L. (1993). “Physiological roles for adenosine and ATP in synaptic transmission in the spinal dorsal horn.” *Prog Neurobiol* **41**(2): 125-56.



- Samways, D. S. and Egan, T. M. (2007). "Acidic amino acids impart enhanced  $\text{Ca}^{2+}$  permeability and flux in two members of the ATP-gated P2X receptor family." *J Gen Physiol* **129**(3): 245-56.
- Sanchez-Nogueiro, J., Marin-Garcia, P. and Miras-Portugal, M. T. (2005). "Characterization of a functional P2X(7)-like receptor in cerebellar granule neurons from P2X(7) knockout mice." *FEBS Lett* **579**(17): 3783-8.
- Sanchez-Ruiloba, L., Cabrera-Poch, N., Rodriguez-Martinez, M., Lopez-Menendez, C., Jean-Mairet, R. M., Higuero, A. M. and Iglesias, T. (2006). "Protein kinase D intracellular localization and activity control kinase D-interacting substrate of 220-kDa traffic through a postsynaptic density-95/discs large/zonula occludens-1-binding motif." *J Biol Chem* **281**(27): 18888-900.
- Santiago-Perez, L. I., Flores, R. V., Santos-Berrios, C., Chorna, N. E., Krugh, B., Garrad, R. C., Erb, L., Weisman, G. A. and Gonzalez, F. A. (2001). "P2Y(2) nucleotide receptor signaling in human monocytic cells: activation, desensitization and coupling to mitogen-activated protein kinases." *J Cell Physiol* **187**(2): 196-208.
- Sauzeau, V., Le Jeune, H., Cario-Toumaniantz, C., Vaillant, N., Gadeau, A. P., Desgranges, C., Scalbert, E., Chardin, P., Pacaud, P. and Loirand, G. (2000). "P2Y(1), P2Y(2), P2Y(4), and P2Y(6) receptors are coupled to Rho and Rho kinase activation in vascular myocytes." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278**(6): H1751-61.
- Savi, P., Beauverger, P., Labouret, C., Delfaud, M., Salel, V., Kaghad, M. and Herbert, J. M. (1998). "Role of P2Y1 purinoceptor in ADP-induced platelet activation." *FEBS Lett* **422**(3): 291-5.
- Savi, P., Zachary, J. L., Delesque-Touchard, N., Labouret, C., Herve, C., Uzabiaga, M. F., Pereillo, J. M., Culouscou, J. M., Bono, F., Ferrara, P. and Herbert, J. M. (2006). "The active metabolite of Clopidogrel disrupts P2Y12 receptor oligomers and partitions them out of lipid rafts." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(29): 11069-74.
- Scemes, E., Duval, N. and Meda, P. (2003). "Reduced expression of P2Y1 receptors in connexin43-null mice alters calcium signaling and migration of neural progenitor cells." *J Neurosci* **23**(36): 11444-52.
- Schmahmann, J. D. (2004). "Disorders of the cerebellum: ataxia, dysmetria of thought, and the cerebellar cognitive affective syndrome." *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* **16**(3): 367-78.
- Schmidt, A., Wolde, M., Thiele, C., Fest, W., Kratzin, H., Podtelejnikov, A. V., Witke, W., Huttner, W. B. and Soling, H. D. (1999). "Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid." *Nature* **401**(6749): 133-41.
- Schnurr, M., Then, F., Galambos, P., Scholz, C., Siegmund, B., Endres, S. and Eigler, A. (2000). "Extracellular ATP and TNF-alpha synergize in the activation and maturation of human dendritic cells." *J Immunol* **165**(8): 4704-9.
- Schwiebert, E. M., Egan, M. E., Hwang, T. H., Fulmer, S. B., Allen, S. S., Cutting, G. R. and Guggino, W. B. (1995). "CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP." *Cell* **81**(7): 1063-73.
- Seino, D., Tokunaga, A., Tachibana, T., Yoshiya, S., Dai, Y., Obata, K., Yamanaka, H., Kobayashi, K. and Noguchi, K. (2006). "The role of ERK signaling and the P2X receptor on mechanical pain evoked by movement of inflamed knee joint." *Pain* **123**(1-2): 193-203.
- Sellers, L. A., Simon, J., Lundahl, T. S., Cousens, D. J., Humphrey, P. P. and Barnard, E. A. (2001). "Adenosine nucleotides acting at the human P2Y1 receptor stimulate mitogen-activated protein kinases and induce apoptosis." *J Biol Chem* **276**(19):

16379-90.

- Sellick, G. S., Rudd, M., Eve, P., Allinson, R., Matutes, E., Catovsky, D. and Houlston, R. S. (2004). "The P2X7 receptor gene A1513C polymorphism does not contribute to risk of familial or sporadic chronic lymphocytic leukemia." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **13**(6): 1065-7.
- Seman, M., Adriouch, S., Scheuplein, F., Krebs, C., Freese, D., Glowacki, G., Deterre, P., Haag, F. and Koch-Nolte, F. (2003). "NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor." *Immunity* **19**(4): 571-82.
- Sen, R. P., Sobrevia, L., Delicado, E. G., Yudilevich, D. and Miras-Portugal, M. T. (1996). "Bovine adrenal endothelial cells express nucleoside transporters nonregulated by protein kinases A and C." *Am J Physiol* **271**(2 Pt 1): C504-10.
- Seye, C. I., Yu, N., Jain, R., Kong, Q., Minor, T., Newton, J., Erb, L., Gonzalez, F. A. and Weisman, G. A. (2003). "The P2Y2 nucleotide receptor mediates UTP-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in coronary artery endothelial cells." *J Biol Chem* **278**(27): 24960-5.
- Shah, B. H. and Catt, K. J. (2002). "Calcium-independent activation of extracellularly regulated kinases 1 and 2 by angiotensin II in hepatic C9 cells: roles of protein kinase Cdelta, Src/proline-rich tyrosine kinase 2, and epidermal growth receptor trans-activation." *Mol Pharmacol* **61**(2): 343-51.
- Shelton, M. K. and McCarthy, K. D. (2000). "Hippocampal astrocytes exhibit Ca<sup>2+</sup>-elevating muscarinic cholinergic and histaminergic receptors in situ." *J Neurochem* **74**(2): 555-63.
- Shen, J. and Dicorleto, P. E. (2008). "ADP Stimulates Human Endothelial Cell Migration via P2Y1 Nucleotide Receptor Mediated Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways." *Circ Res*.
- Shen, J. B., Pappano, A. J. and Liang, B. T. (2006). "Extracellular ATP-stimulated current in wild-type and P2X4 receptor transgenic mouse ventricular myocytes: implications for a cardiac physiologic role of P2X4 receptors." *Faseb J* **20**(2): 277-84.
- Sidorenko, S. P., Law, C. L., Klaus, S. J., Chandran, K. A., Takata, M., Kurosaki, T. and Clark, E. A. (1996). "Protein kinase C mu (PKC mu) associates with the B cell antigen receptor complex and regulates lymphocyte signaling." *Immunity* **5**(4): 353-63.
- Silberberg, S. D., Chang, T. H. and Swartz, K. J. (2005). "Secondary structure and gating rearrangements of transmembrane segments in rat P2X4 receptor channels." *J Gen Physiol* **125**(4): 347-59.
- Silinsky, E. M., Gerzanich, V. and Vanner, S. M. (1992). "ATP mediates excitatory synaptic transmission in mammalian neurones." *Br J Pharmacol* **106**(4): 762-3.
- Simard, M., Arcuino, G., Takano, T., Liu, Q. S. and Nedergaard, M. (2003). "Signaling at the gliovascular interface." *J Neurosci* **23**(27): 9254-62.
- Simon, J., Filippov, A. K., Goransson, S., Wong, Y. H., Frelin, C., Michel, A. D., Brown, D. A. and Barnard, E. A. (2002). "Characterization and channel coupling of the P2Y(12) nucleotide receptor of brain capillary endothelial cells." *J Biol Chem* **277**(35): 31390-400.
- Simon, J., Kidd, E. J., Smith, F. M., Chessell, I. P., Murrell-Lagnado, R., Humphrey, P. P. and Barnard, E. A. (1997). "Localization and functional expression of splice variants of the P2X2 receptor." *Mol Pharmacol* **52**(2): 237-48.
- Simons, K. and Toomre, D. (2000). "Lipid rafts and signal transduction." *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**(1): 31-9.
- Smart, M. L., Gu, B., Panchal, R. G., Wiley, J., Cromer, B., Williams, D. A. and Petrou,

- S. (2003). "P2X7 receptor cell surface expression and cytolytic pore formation are regulated by a distal C-terminal region." *J Biol Chem* **278**(10): 8853-60.
- Sokolova, E., Skorinkin, A., Fabbretti, E., Masten, L., Nistri, A. and Giniatullin, R. (2004). "Agonist-dependence of recovery from desensitization of P2X(3) receptors provides a novel and sensitive approach for their rapid up or downregulation." *Br J Pharmacol* **141**(6): 1048-58.
- Solini, A., Chiozzi, P., Morelli, A., Fellin, R. and Di Virgilio, F. (1999). "Human primary fibroblasts in vitro express a purinergic P2X7 receptor coupled to ion fluxes, microvesicle formation and IL-6 release." *J Cell Sci* **112** ( Pt 3): 297-305.
- Soltoff, S. P., Avraham, H., Avraham, S. and Cantley, L. C. (1998). "Activation of P2Y2 receptors by UTP and ATP stimulates mitogen-activated kinase activity through a pathway that involves related adhesion focal tyrosine kinase and protein kinase C." *J Biol Chem* **273**(5): 2653-60.
- Sorenson, E. M. and Gallagher, J. P. (1996). "The membrane hyperpolarization of rat dorsolateral septal nucleus neurons is mediated by a novel nicotinic receptor." *J Pharmacol Exp Ther* **277**(3): 1733-43.
- Soto, F., Garcia-Guzman, M., Karschin, C. and Stuhmer, W. (1996). "Cloning and tissue distribution of a novel P2X receptor from rat brain." *Biochem Biophys Res Commun* **223**(2): 456-60.
- Soto, F. and Rubio, M. E. (2001). "Cloned P2X receptor sub-units in cerebellum and hippocampus." *Drug Dev Res* **52**: 139.
- Souslova, V., Cesare, P., Ding, Y., Akopian, A. N., Stanfa, L., Suzuki, R., Carpenter, K., Dickenson, A., Boyce, S., Hill, R., Nebunius-Oosthuizen, D., Smith, A. J., Kidd, E. J. and Wood, J. N. (2000). "Warm-coding deficits and aberrant inflammatory pain in mice lacking P2X3 receptors." *Nature* **407**(6807): 1015-7.
- Sperlagh, B., Vizi, E. S., Wirkner, K. and Illes, P. (2006). "P2X7 receptors in the nervous system." *Prog Neurobiol* **78**(6): 327-46.
- Stafford, M. R., Bartlett, P. F. and Adams, D. J. (2007). "Purinergic receptor activation inhibits mitogen-stimulated proliferation in primary neurospheres from the adult mouse subventricular zone." *Mol Cell Neurosci* **35**(4): 535-48.
- Stefan, C., Jansen, S. and Bollen, M. (2006). "Modulation of purinergic signaling by NPP-type ectophosphodiesterases." *Purinergic signalling* **2**: 361-370.
- Stoop, R., Thomas, S., Rassendren, F., Kawashima, E., Buell, G., Surprenant, A. and North, R. A. (1999). "Contribution of individual subunits to the multimeric P2X(2) receptor: estimates based on methanethiosulfonate block at T336C." *Mol Pharmacol* **56**(5): 973-81.
- Storz, P., Doppler, H. and Toker, A. (2004). "Protein kinase Cdelta selectively regulates protein kinase D-dependent activation of NF-kappaB in oxidative stress signaling." *Mol Cell Biol* **24**(7): 2614-26.
- Storz, P., Doppler, H. and Toker, A. (2005). "Protein kinase D mediates mitochondrion-to-nucleus signaling and detoxification from mitochondrial reactive oxygen species." *Mol Cell Biol* **25**(19): 8520-30.
- Storz, P., Hausser, A., Link, G., Dedio, J., Ghebrehwet, B., Pfizenmaier, K. and Johannes, F. J. (2000). "Protein kinase C [micro] is regulated by the multifunctional chaperon protein p32." *J Biol Chem* **275**(32): 24601-7.
- Storz, P. and Toker, A. (2003). "Protein kinase D mediates a stress-induced NF-kappaB activation and survival pathway." *Embo J* **22**(1): 109-20.
- Sturany, S., Van Lint, J., Gilchrist, A., Vandenheede, J. R., Adler, G. and Seufferlein, T. (2002). "Mechanism of activation of protein kinase D2(PKD2) by the CCK(B)/

- gastrin receptor." *J Biol Chem* **277**(33): 29431-6.
- Sturany, S., Van Lint, J., Muller, F., Wilda, M., Hameister, H., Hocker, M., Brey, A., Gern, U., Vandenheede, J., Gress, T., Adler, G. and Seufferlein, T. (2001). "Molecular cloning and characterization of the human protein kinase D2. A novel member of the protein kinase D family of serine threonine kinases." *J Biol Chem* **276**(5): 3310-8.
- Suadicani, S. O., Brosnan, C. F. and Scemes, E. (2006). "P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca<sup>2+</sup> signaling." *J Neurosci* **26**(5): 1378-85.
- Sugawara, Y., Nishii, H., Takahashi, T., Yamauchi, J., Mizuno, N., Tago, K. and Itoh, H. (2007). "The lipid raft proteins flotillins/reggies interact with Galphaq and are involved in Gq-mediated p38 mitogen-activated protein kinase activation through tyrosine kinase." *Cell Signal* **19**(6): 1301-8.
- Sun, S. H., Lin, L. B., Hung, A. C. and Kuo, J. S. (1999). "ATP-stimulated Ca<sup>2+</sup> influx and phospholipase D activities of a rat brain-derived type-2 astrocyte cell line, RBA-2, are mediated through P2X7 receptors." *J Neurochem* **73**(1): 334-43.
- Sunahara, R. K., Dessauer, C. W. and Gilman, A. G. (1996). "Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **36**: 461-80.
- Surprenant, A., Rassendren, F., Kawashima, E., North, R. A. and Buell, G. (1996). "The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7)." *Science* **272**(5262): 735-8.
- Syed, N., Martens, C. A. and Hsu, W. H. (2007). "Arginine vasopressin increases glutamate release and intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in hippocampal and cortical astrocytes through two distinct receptors." *J Neurochem* **103**(1): 229-37.
- Takasaki, J., Kamohara, M., Saito, T., Matsumoto, M., Matsumoto, S., Ohishi, T., Soga, T., Matsushime, H. and Furuichi, K. (2001). "Molecular cloning of the platelet P2T(AC) ADP receptor: pharmacological comparison with another ADP receptor, the P2Y(1) receptor." *Mol Pharmacol* **60**(3): 432-9.
- Takenouchi, T., Ogihara, K., Sato, M. and Kitani, H. (2005). "Inhibitory effects of U73122 and U73343 on Ca<sup>2+</sup> influx and pore formation induced by the activation of P2X7 nucleotide receptors in mouse microglial cell line." *Biochim Biophys Acta* **1726**(2): 177-86.
- Thelin, W. R. and Boucher, R. C. (2007). "The epithelium as a target for therapy in cystic fibrosis." *Curr Opin Pharmacol* **7**(3): 290-5.
- Tokumura, A., Majima, E., Kariya, Y., Tominaga, K., Kogure, K., Yasuda, K. and Fukuzawa, K. (2002). "Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase." *J Biol Chem* **277**(42): 39436-42.
- Tominaga, M., Wada, M. and Masu, M. (2001). "Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(12): 6951-6.
- Torres, G. E., Egan, T. M. and Voigt, M. M. (1998). "N-Linked glycosylation is essential for the functional expression of the recombinant P2X2 receptor." *Biochemistry* **37**(42): 14845-51.
- Torres, G. E., Egan, T. M. and Voigt, M. M. (1999). "Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners." *J Biol Chem* **274**(10): 6653-9.
- Torres, G. E., Haines, W. R., Egan, T. M. and Voigt, M. M. (1998). "Co-expression of P2X1 and P2X5 receptor subunits reveals a novel ATP-gated ion channel." *Mol Pharmacol* **54**(6): 989-93.



- Toth-Zsamboki, E., Oury, C., Watanabe, H., Nilius, B., Vermeylen, J. and Hoylaerts, M. F. (2002). "The intracellular tyrosine residues of the ATP-gated P2X(1) ion channel are essential for its function." *FEBS Lett* **524**(1-3): 15-9.
- Townsend-Nicholson, A., King, B. F., Wildmann, S. S. and Burnstock, G. (1999). "Molecular cloning, functional characterization and possible cooperativity between murine P2X4 and P2X4a receptors." *Mol Brain Res* **64**: 246-254.
- Trauzold, A., Schmiedel, S., Sipos, B., Wermann, H., Westphal, S., Roder, C., Klapper, W., Arlt, A., Lehnert, L., Ungefroren, H., Johannes, F. J. and Kalthoff, H. (2003). "PKCmu prevents CD95-mediated apoptosis and enhances proliferation in pancreatic tumour cells." *Oncogene* **22**(55): 8939-47.
- Ullian, E. M. and Barres, B. A. (2002). "Control of synaptic receptivity." *Soc Neurosci Abstr*: 730.6.
- Ullian, E. M., Sapperstein, S. K., Christopherson, K. S. and Barres, B. A. (2001). "Control of synapse number by glia." *Science* **291**(5504): 657-61.
- Umezū-Goto, M., Kishi, Y., Taira, A., Hama, K., Dohmae, N., Takio, K., Yamori, T., Mills, G. B., Inoue, K., Aoki, J. and Arai, H. (2002). "Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production." *J Cell Biol* **158**(2): 227-33.
- Urano, T., Nishimori, H., Han, H., Furuhata, T., Kimura, Y., Nakamura, Y. and Tokino, T. (1997). "Cloning of P2XM, a novel human P2X receptor gene regulated by p53." *Cancer Res* **57**(15): 3281-7.
- van Biesen, T., Hawes, B. E., Raymond, J. R., Luttrell, L. M., Koch, W. J. and Lefkowitz, R. J. (1996). "G(o)-protein alpha-subunits activate mitogen-activated protein kinase via a novel protein kinase C-dependent mechanism." *J Biol Chem* **271**(3): 1266-9.
- van Biesen, T., Luttrell, L. M., Hawes, B. E. and Lefkowitz, R. J. (1996). "Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors." *Endocr Rev* **17**(6): 698-714.
- Van Lint, J., Rykx, A., Maeda, Y., Vantus, T., Sturany, S., Malhotra, V., Vandenheede, J. R. and Seufferlein, T. (2002). "Protein kinase D: an intracellular traffic regulator on the move." *Trends Cell Biol* **12**(4): 193-200.
- Vega, R. B., Harrison, B. C., Meadows, E., Roberts, C. R., Papst, P. J., Olson, E. N. and McKinsey, T. A. (2004). "Protein kinases C and D mediate agonist-dependent cardiac hypertrophy through nuclear export of histone deacetylase 5." *Mol Cell Biol* **24**(19): 8374-85.
- Velazquez, B., Garrad, R. C., Weisman, G. A. and Gonzalez, F. A. (2000). "Differential agonist-induced desensitization of P2Y2 nucleotide receptors by ATP and UTP." *Mol Cell Biochem* **206**(1-2): 75-89.
- Vertommen, D., Rider, M., Ni, Y., Waelkens, E., Merlevede, W., Vandenheede, J. R. and Van Lint, J. (2000). "Regulation of protein kinase D by multisite phosphorylation. Identification of phosphorylation sites by mass spectrometry and characterization by site-directed mutagenesis." *J Biol Chem* **275**(26): 19567-76.
- Vial, C. and Evans, R. J. (2002). "P2X(1) receptor-deficient mice establish the native P2X receptor and a P2Y6-like receptor in arteries." *Mol Pharmacol* **62**(6): 1438-45.
- Vial, C., Fung, C. Y., Goodall, A. H., Mahaut-Smith, M. P. and Evans, R. J. (2006). "Differential sensitivity of human platelet P2X1 and P2Y1 receptors to disruption of lipid rafts." *Biochem Biophys Res Commun* **343**(2): 415-9.
- Vial, C., Roberts, J. A. and Evans, R. J. (2004). "Molecular properties of ATP-gated P2X receptor ion channels." *Trends Pharmacol Sci* **25**(9): 487-93.
- Virginio, C., Church, D., North, R. A. and Surprenant, A. (1997). "Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor." *Neuropharmacology* **36**(9):

1285-94.

- Virginio, C., MacKenzie, A., North, R. A. and Surprenant, A. (1999). "Kinetics of cell lysis, dye uptake and permeability changes in cells expressing the rat P2X7 receptor." *J Physiol* **519 Pt 2**: 335-46.
- Virginio, C., Robertson, G., Surprenant, A. and North, R. A. (1998). "Trinitrophenyl-substituted nucleotides are potent antagonists selective for P2X1, P2X3, and heteromeric P2X2/3 receptors." *Mol Pharmacol* **53**(6): 969-73.
- Volterra, A. and Bezzi, P. (2002). Release of transmitters from glial cells. *The Tripartite Synapse*. V. e. al, Oxford University Presss: 164-182.
- von Kugelgen, I. and Wetter, A. (2000). "Molecular pharmacology of P2Y-receptors." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **362**(4-5): 310-23.
- Waldo, G. L., Corbitt, J., Boyer, J. L., Ravi, G., Kim, H. S., Ji, X. D., Lacy, J., Jacobson, K. A. and Harden, T. K. (2002). "Quantitation of the P2Y(1) receptor with a high affinity radiolabeled antagonist." *Mol Pharmacol* **62**(5): 1249-57.
- Waldo, G. L. and Harden, T. K. (2004). "Agonist binding and Gq-stimulating activities of the purified human P2Y1 receptor." *Mol Pharmacol* **65**(2): 426-36.
- Waldron, R. T., Rey, O., Iglesias, T., Tugal, T., Cantrell, D. and Rozengurt, E. (2001). "Activation loop Ser744 and Ser748 in protein kinase D are transphosphorylated in vivo." *J Biol Chem* **276**(35): 32606-15.
- Waldron, R. T. and Rozengurt, E. (2000). "Oxidative stress induces protein kinase D activation in intact cells. Involvement of Src and dependence on protein kinase C." *J Biol Chem* **275**(22): 17114-21.
- Waldron, R. T. and Rozengurt, E. (2003). "Protein kinase C phosphorylates protein kinase D activation loop Ser744 and Ser748 and releases autoinhibition by the pleckstrin homology domain." *J Biol Chem* **278**(1): 154-63.
- Waldron, R. T., Whitelegge, J. P., Faull, K. F. and Rozengurt, E. (2007). "Identification of a novel phosphorylation site in c-jun directly targeted in vitro by protein kinase D." *Biochem Biophys Res Commun* **356**(2): 361-7.
- Wang, L., Andersson, M., Karlsson, L., Watson, M. A., Cousens, D. J., Jern, S. and Erlinge, D. (2003). "Increased mitogenic and decreased contractile P2 receptors in smooth muscle cells by shear stress in human vessels with intact endothelium." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**(8): 1370-6.
- Wang, Y., Small, D. L., Stanimirovic, D. B., Morley, P. and Durkin, J. P. (1997). "AMPA receptor-mediated regulation of a Gi-protein in cortical neurons." *Nature* **389**(6650): 502-4.
- Wang, Y., Waldron, R. T., Dhaka, A., Patel, A., Riley, M. M., Rozengurt, E. and Colicelli, J. (2002). "The RAS effector RIN1 directly competes with RAF and is regulated by 14-3-3 proteins." *Mol Cell Biol* **22**(3): 916-26.
- Washburn, K. B. and Neary, J. T. (2006). "P2 purinergic receptors signal to STAT3 in astrocytes: Difference in STAT3 responses to P2Y and P2X receptor activation." *Neuroscience* **142**(2): 411-23.
- Watanabe, D. and Nakanishi, S. (2003). "mGluR2 postsynaptically senses granule cell inputs at Golgi cell synapses." *Neuron* **39**(5): 821-9.
- Webb, T. E., Feolde, E., Vigne, P., Neary, J. T., Runberg, A., Frelin, C. and Barnard, E. A. (1996). "The P2Y purinoceptor in rat brain microvascular endothelial cells couple to inhibition of adenylate cyclase." *Br J Pharmacol* **119**(7): 1385-92.
- Webb, T. E., Henderson, D., King, B. F., Wang, S., Simon, J., Bateson, A. N., Burnstock, G. and Barnard, E. A. (1996). "A novel G protein-coupled P2 purinoceptor (P2Y3) activated preferentially by nucleoside diphosphates." *Mol Pharmacol* **50**(2): 258-

65.

- Weissman, T. A., Riquelme, P. A., Ivic, L., Flint, A. C. and Kriegstein, A. R. (2004). "Calcium waves propagate through radial glial cells and modulate proliferation in the developing neocortex." *Neuron* **43**(5): 647-61.
- Werner, P., Seward, E. P., Buell, G. N. and North, R. A. (1996). "Domains of P2X receptors involved in desensitization." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(26): 15485-90.
- Wilkin, F., Duhant, X., Bruyns, C., Suarez-Huerta, N., Boeynaems, J. M. and Robaye, B. (2001). "The P2Y<sub>11</sub> receptor mediates the ATP-induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells." *J Immunol* **166**(12): 7172-7.
- Wong, C. and Jin, Z. G. (2005). "Protein kinase C-dependent protein kinase D activation modulates ERK signal pathway and endothelial cell proliferation by vascular endothelial growth factor." *J Biol Chem* **280**(39): 33262-9.
- Woods, A. J., White, D. P., Caswell, P. T. and Norman, J. C. (2004). "PKD1/PKCmu promotes  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin recycling and delivery to nascent focal adhesions." *Embo J* **23**(13): 2531-43.
- Worthington, R. A., Smart, M. L., Gu, B. J., Williams, D. A., Petrou, S., Wiley, J. S. and Barden, J. A. (2002). "Point mutations confer loss of ATP-induced human P2X<sub>7</sub> receptor function." *FEBS Lett* **512**(1-3): 43-6.
- Xiang, Z. and Burnstock, G. (2005). "Changes in expression of P2X purinoceptors in rat cerebellum during postnatal development." *Brain Res Dev Brain Res* **156**(2): 147-57.
- Xiang, Z., Lv, J., Jiang, P., Chen, C., Jiang, B. and Burnstock, G. (2006). "Expression of P2X receptors on immune cells in the rat liver during postnatal development." *Histochem Cell Biol* **126**(4): 453-63.
- Yamamoto, K., Korenaga, R., Kamiya, A. and Ando, J. (2000). "Fluid shear stress activates Ca<sup>2+</sup> influx into human endothelial cells via P2X<sub>4</sub> purinoceptors." *Circ Res* **87**(5): 385-91.
- Ye, Z. C., Wyeth, M. S., Baltan-Tekkok, S. and Ransom, B. R. (2003). "Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release." *J Neurosci* **23**(9): 3588-96.
- Yeaman, C., Ayala, M. I., Wright, J. R., Bard, F., Bossard, C., Ang, A., Maeda, Y., Seufferlein, T., Mellman, I., Nelson, W. J. and Malhotra, V. (2004). "Protein kinase D regulates basolateral membrane protein exit from trans-Golgi network." *Nat Cell Biol* **6**(2): 106-12.
- Yerxa, B. R., Sabater, J. R., Davis, C. W., Stutts, M. J., Lang-Furr, M., Picher, M., Jones, A. C., Cowlen, M., Dougherty, R., Boyer, J., Abraham, W. M. and Boucher, R. C. (2002). "Pharmacology of INS37217 [P(1)-(uridine 5')-P(4)-(2'-deoxycytidine 5') tetraphosphate, tetrasodium salt], a next-generation P2Y<sub>2</sub> receptor agonist for the treatment of cystic fibrosis." *J Pharmacol Exp Ther* **302**(3): 871-80.
- Yokomizo, T., Izumi, T., Chang, K., Takuwa, Y. and Shimizu, T. (1997). "A G-protein-coupled receptor for leukotriene B<sub>4</sub> that mediates chemotaxis." *Nature* **387**(6633): 620-4.
- Yoshioka, K., Hosoda, R., Kuroda, Y. and Nakata, H. (2002). "Hetero-oligomerization of adenosine A<sub>1</sub> receptors with P2Y<sub>1</sub> receptors in rat brains." *FEBS Lett* **531**(2): 299-303.
- Yoshioka, K., Saitoh, O. and Nakata, H. (2001). "Heteromeric association creates a P2Y-like adenosine receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(13): 7617-22.
- Yoshioka, K., Saitoh, O. and Nakata, H. (2002). "Agonist-promoted heteromeric oligomerization between adenosine A<sub>1</sub> and P2Y<sub>1</sub> receptors in living cells." *FEBS Lett* **523**(1-3): 147-51.



- Young, M. T., Pelegrin, P. and Surprenant, A. (2007). "Amino acid residues in the P2X7 receptor that mediate differential sensitivity to ATP and BzATP." *Mol Pharmacol* **71**(1): 92-100.
- Yuan, J., Slice, L., Walsh, J. H. and Rozengurt, E. (2000). "Activation of protein kinase D by signaling through the alpha subunit of the heterotrimeric G protein G(q)." *J Biol Chem* **275**(3): 2157-64.
- Yuan, J., Slice, L. W. and Rozengurt, E. (2001). "Activation of protein kinase D by signaling through Rho and the alpha subunit of the heterotrimeric G protein G13." *J Biol Chem* **276**(42): 38619-27.
- Zemkova, H., He, M. L., Koshimizu, T. A. and Stojilkovic, S. S. (2004). "Identification of ectodomain regions contributing to gating, deactivation, and resensitization of purinergic P2X receptors." *J Neurosci* **24**(31): 6968-78.
- Zhang, F. L., Luo, L., Gustafson, E., Lachowicz, J., Smith, M., Qiao, X., Liu, Y. H., Chen, G., Pramanik, B., Laz, T. M., Palmer, K., Bayne, M. and Monsma, F. J., Jr. (2001). "ADP is the cognate ligand for the orphan G protein-coupled receptor SP1999." *J Biol Chem* **276**(11): 8608-15.
- Zhang, F. L., Luo, L., Gustafson, E., Palmer, K., Qiao, X., Fan, X., Yang, S., Laz, T. M., Bayne, M. and Monsma, F., Jr. (2002). "P2Y(13): identification and characterization of a novel Galpha-i-coupled ADP receptor from human and mouse." *J Pharmacol Exp Ther* **301**(2): 705-13.
- Zhang, Q., Pangrsic, T., Kreft, M., Krzan, M., Li, N., Sul, J. Y., Halassa, M., Van Bockstaele, E., Zorec, R. and Haydon, P. G. (2004). "Fusion-related release of glutamate from astrocytes." *J Biol Chem* **279**(13): 12724-33.
- Zhang, X. and Neufeld, A. H. (2007). "Signal transduction pathways for epidermal growth factor stimulated cyclooxygenase-2 induction in astrocytes." *Exp Eye Res* **85**(2): 280-8.
- Zhang, X., Zhang, M., Laties, A. M. and Mitchell, C. H. (2005). "Stimulation of P2X7 receptors elevates Ca<sup>2+</sup> and kills retinal ganglion cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**(6): 2183-91.
- Zhang, Z., Chen, G., Zhou, W., Song, A., Xu, T., Luo, Q., Wang, W., Gu, X. S. and Duan, S. (2007). "Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis." *Nat Cell Biol* **9**(8): 945-53.
- Zhao, H. B., Yu, N. and Fleming, C. R. (2005). "Gap junctional hemichannel-mediated ATP release and hearing controls in the inner ear." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(51): 18724-9.
- Zhong, X., Kriz, R., Sehra, J. and Kumar, R. (2004). "N-linked glycosylation of platelet P2Y12 ADP receptor is essential for signal transduction but not for ligand binding or cell surface expression." *FEBS Lett* **562**(1-3): 111-7.
- Zhukova, E., Sinnott-Smith, J. and Rozengurt, E. (2001). "Protein kinase D potentiates DNA synthesis and cell proliferation induced by bombesin, vasopressin, or phorbol esters in Swiss 3T3 cells." *J Biol Chem* **276**(43): 40298-305.
- Zimmermann, H. (1978). "Turnover of adenine nucleotides in cholinergic synaptic vesicles of the Torpedo electric organ." *Neuroscience* **3**(9): 827-36.
- Zimmermann, H. (2000). "Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides." *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **362**(4-5): 299-309.
- Zimmermann, H. and Denston, C. R. (1976). "Adenosine triphosphate in cholinergic vesicles isolated from the electric organ of *Electrophorus electricus*." *Brain Res* **111**(2): 365-76.
- Zinchuk, V. S., Okada, T., Kobayashi, T. and Seguchi, H. (1999). "Ecto-ATPase activity in

- cerebellum: implication to the function of synaptic transmission.” *Brain Res* **815**(1): 111-5.
- Zonta, M., Angulo, M. C., Gobbo, S., Rosengarten, B., Hossmann, K. A., Pozzan, T. and Carmignoto, G. (2003). “Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation.” *Nat Neurosci* **6**(1): 43-50.
- Zugaza, J. L., Sinnett-Smith, J., Van Lint, J. and Rozengurt, E. (1996). “Protein kinase D (PKD) activation in intact cells through a protein kinase C-dependent signal transduction pathway.” *Embo J* **15**(22): 6220-30.